

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Hana Svobodová

**Povrchová exprese inhibiční molekuly Tim-3 u antigenně specifických
CD8⁺ T buněk expandovaných *in vitro* pomocí dendritických buněk za účelem
nádorové buněčné imunoterapie**

Surface expression of Tim-3 inhibitory molecule on antigen-specific CD8⁺ T cells
expanded *in vitro* using dendritic cells for cell-based cancer immunotherapy

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: **RNDr. Daniel Smrž, Ph.D.**

Konzultantka: **MUDr. Zuzana Střížová**

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

Hana Svobodová

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala především svému školiteli RNDr. Danielu Smržovi, Ph.D. za jeho odborné vedení, vstřícnost a ochotu při zpracovávání diplomového projektu, za předané zkušenosti a cenné rady. Obrovské díky patří také mé konzultantce MUDr. Zuzaně Střížové za pomoc, podporu a čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Pavle Tábořské, která mi pomáhala s experimenty, a MUDr. Dmitry Stakheevu, který mi byl vždy nápomocen. V neposlední řadě patří mé poděkování prof. MUDr. Jiřině Bartůňkové, DrSc., MBA za to, že mi umožnila pracovat na projektu mé diplomové práce na Ústavu imunologie 2. lékařské fakulty a Fakultní nemocnici v Motole. Děkuji také ostatním členům Ústavu imunologie za ochotu a poskytnuté rady. Nakonec bych touto cestou ráda poděkovala své rodině a blízkým, kteří mi byli velikou oporou během studia.

Práce vznikla za finanční podpory grantů Univerzity Karlovy – projekty GA UK č. 364218 a PRIMUS/MED/12, grantu Ministerstva zdravotnictví České republiky – projekt AZV 16-28135A a interního grantu Fakultní nemocnice v Motole.

ABSTRAKT

Nádorové onemocnění je celosvětově druhou nejčastější příčinou úmrtí a počet pacientů s tímto onemocněním se každoročně zvyšuje. Současné možnosti terapie stojí na čtyřech základních pilířích; chirurgie, chemoterapie, radioterapie a imunoterapie. Imunoterapie je v posledních letech nejrychleji se rozvíjející léčebnou modalitou, která u některých pacientů vykazuje nebývalé účinky. Většina pacientů však na tuto terapii stále nereaguje. Zkoumány jsou proto mechanismy, díky nimž je imunoterapie neúčinná. Buněčná imunoterapie nádorových onemocnění je léčebnou metodou, která k terapeutickým účelům využívá živé *ex vivo* připravené imunitní buňky cílící na nádor. Jedním z mechanismů, který může snižovat její účinnost, je exprese inhibičních molekul na povrchu připravených imunitních buněk. Tim-3 je inhibiční molekula, která přitahuje zájem výzkumu několik posledních let, jelikož exprese Tim-3 na nádorových buňkách a imunitních buňkách infiltrujících nádor je často spojena s horší prognózou a agresivnějšími formami nádorového onemocnění. Úlohu Tim-3 u *in vitro* nebo *ex vivo* připravovaných imunitních buněk je však stále obtížné predikovat. V této práci byl vyvinut *in vitro* studijní model, který využívá *in vitro* připravené antigen specifické CD8⁺ T buňky s vysokou expresí Tim-3. Bylo zjištěno, že exprese molekuly Tim-3 v těchto buňkách je podmíněna přítomností cytokinu IL-2 v kultivačním médiu a že míra této exprese závisí na koncentraci tohoto cytokinu. Překvapivé bylo zjištění, že exprese Tim-3 je značně reverzibilní, jelikož odstranění cytokinu z kultivačního média vedlo k podstatnému snížení její exprese. Další analýzy odhalily, že míra exprese Tim-3 významně neovlivnila aktivaci buněk jejich příslušným antigenem. Avšak po stimulaci v přítomnosti galektinu-9, ligandu Tim-3, byla zaznamenána mírná, ale statisticky významná inhibice aktivace CD8⁺ T buněk zprostředkované antigenem. Výsledky této práce ukázaly, že exprese Tim-3 u *in vitro* generovaných antigen specifických T buněk je dynamická a že navázání jeho ligandu může částečně inhibovat antigenem zprostředkovanou aktivaci CD8⁺ T buněk. Tato zjištění mohou mít význam při navrhování protokolů pro přípravu imunitních buněk pro imunoterapii nádorových onemocnění.

Klíčová slova: Adoptivní buněčná imunoterapie, imunitní rezistence, dendritické buňky, CD8⁺ T buňky, Tim-3, interleukin 2, galektin-9

ABSTRACT

Cancer is the second most common cause of death in the world, and the number of people with the disease increases each year. The therapy of the disease currently stands on four pillars; surgery, chemotherapy, radiotherapy, and immunotherapy. Through the past few years, immunotherapy has become the fastest developing treatment modality. However, despite its unprecedented efficacy in some patients, the majority of patients still does not respond to the therapy. Therefore, there is a need to investigate the mechanisms that make immunotherapy inefficient. Cell-based cancer immunotherapy is the treatment modality which uses live *ex vivo*-produced tumor-targeting immune cells to treat cancer. One of the mechanisms that may compromise its therapeutic efficacy is the expression of inhibitory molecules on the surface of the produced immune cells. Tim-3 is the inhibitory molecule which attracts attention in recent years. Tim-3 expression in the tumor cells and the tumor-infiltrating immune cells is often associated with worse prognosis and more aggressive forms of the disease. However, its role in the *in vitro* or *ex vivo*-produced immune cells is difficult to predict. In this work, an *in vitro* study model which is based on *in vitro*-produced antigen-specific CD8⁺ T cells with high expression of Tim-3 has been developed. Tim-3 expression in these cells was found to be conditioned by the presence of the cytokine IL-2 in the culture medium and the extent of its expression dependent on the cytokine concentration. Surprisingly, the expression of Tim-3 was substantially reversible because removal of the cytokine from the culture medium led to a substantial decrease of Tim-3 expression. Further analyses revealed that the extent of Tim-3 expression did not significantly affect the activation of the cells with their respective antigen. However, galectin-9, a Tim-3 ligand, showed a mild but significant inhibition of the antigen-mediated activation of CD8⁺ T cells. The results of this work showed that the expression of Tim-3 in the *in vitro*-produced antigen-specific T cells is dynamic and that its engagement can partially inhibit antigen-mediated activation of CD8⁺ T cells. These findings may have important ramification for designing the protocols for the production of immune cells for cancer immunotherapy.

Key words: Adoptive cell immunotherapy, immune resistance, dendritic cells, CD8⁺ T cells, Tim-3, interleukin 2, galectin-9

OBSAH

1 ÚVOD.....	10
2 TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1 Nádorová onemocnění.....	11
2.2 Tradiční způsoby léčby nádorových onemocnění.....	11
2.2.1 Chirurgická onkologie, chemoterapie a radioterapie.....	12
2.2.2 Hormonální a biologická léčba nádorových onemocnění.....	13
2.3 Imunoterapie nádorových onemocnění.....	13
2.3.1 Nebuněčná aktivní imunoterapie.....	15
2.3.2 Nebuněčná pasivní imunoterapie.....	21
2.4 Buněčná imunoterapie nádorových onemocnění.....	23
2.4.1 Dendritické buňky.....	23
2.4.2 T buňky.....	27
2.5 Rezistence k pasivní adoptivní T buněčné imunoterapii.....	31
2.5.1 Tim-3.....	31
3 CÍLE PRÁCE.....	38
4 METODY.....	39
4.1 <i>In vitro</i> příprava a charakterizace maturovaných DC.....	39
4.1.1 Izolace PBMC z buffy coatů zdravých dárců pomocí hustotní gradientové centrifugace.....	40
4.1.2 Frakcionace PBMC na lymfocyty a monocyty.....	41
4.1.3 Zpracování lymfocytů z PBMC.....	41
4.1.4 Diferenciace monocytů na nezralé DC.....	42
4.1.5 Maturace DC.....	42
4.1.6 Charakterizace maturovaných DC.....	43
4.2 <i>In vitro</i> příprava expandovaných antigen specifických T buněk.....	44
4.2.1 Priming lymfocytů alogenními DC.....	45
4.2.2 Repriming T buněk UV inaktivovanou nádorovou linií PC-3.....	46

4.3 Detekce antigen specifických CD8 ⁺ T buněk po stimulaci živými PC-3 buňkami	47
4.4 Statistická analýza	49
5 VÝSLEDKY	50
5.1 <i>In vitro</i> příprava a charakterizace DC	50
5.2 <i>In vitro</i> příprava antigen specifických T buněk	53
5.3 Antigenní specificita <i>in vitro</i> připravených T buněk vůči nádorovým buňkám PC-3	54
5.4 Exprese Tim-3 u <i>in vitro</i> připravených T buněk	55
5.5 Funkční role Tim-3 u <i>in vitro</i> připravených antigen specifických T buněk	58
6 DISKUZE	61
7 ZÁVĚR	67
8 LITERATURA	68

SEZNAM ZKRATEK

ACI	adoptivní buněčná imunoterapie (adoptive cell immunotherapy)
ADCC	buněčná cytotoxicita zprostředkovaná protilátkami (antibody-dependent cellular cytotoxicity)
Ag	antigen
AIDS	syndrom získané imunitní deficeience (acquired immune deficiency syndrome)
AML	akutní myeloidní leukemie (acute myeloid leukemia)
Bat-3	HLA-B asociovaný transkript 3 (HLA-B-associated transcript 3)
CAR	chimerní antigenní receptor (chimeric antigen receptor)
CCL	chemokin
CD	diferenční skupina (cluster of differentiation)
CDC	na komplementu závislá cytotoxicita (complement-dependent cytotoxicity)
CEACAM-1	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1
CRISPR	segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetitiv (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)
CTL	cytotoxické T lymfocyty (cytotoxic T cells)
CTLA-4	antigen asociovaný s cytotoxickými T lymfocyty 4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4)
DAMP	s nebezpečím/poškozením asociované molekulární struktury (danger/damage-associated molecular patterns)
DAPI	4',6-diamidin-2-fenylindol (4',6-diamidino-2-phenylindole)
DC	dendritické buňky (dendritic cells)
DMSO	dimethylsulfoxid
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina (ethylenediaminetetraacetic acid)
EMA	Evropská léková agentura (European Medicines Agency)
FBS	fetální bovinní sérum (fetal bovine serum)
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (Food and drug administration)
Gal-9	galektin-9 (galectin-9)
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
HAVCR2	hepatitis A virus cellular receptor 2
HCL	leukemie z vlasatých buněk (hairy cell leukemia)
HIF-1	hypoxií indukovaný faktor 1 (hypoxia-inducible factor 1)
HIV-1	virus lidské imunodeficiency 1 (human immunodeficiency virus 1)
HLA-A2	lidský leukocytární antigen (human leukocyte antigen)
HMGB1	high mobility group box-1
ICAM-1	intracelulární adhezní molekula 1 (intercellular adhesion molecule 1)
iDC	nezralé DC (immature DC)
IFN	interferon
IgG	imunoglobulin G (immunoglobulin G)
IgV	variabilní doména (variable domain)
IL	interleukin
ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
ITSM	immunoreceptor tyrosine-based switch motif
IU	mezinárodní jednotka (international unit)
KM	kompletní médium
LAT	linker for activation of T cells
Lck	lymphocyte-specific tyrosine kinase
LFA-3	lymphocyte function-associated antigen 3

LM	lymfocytární médium
LPS	lipopolysacharid
LSC	leukemické kmenové buňky (leukemic stem cells)
mAb	monoklonální protilátka (monoclonal antibody)
MAGE-A3	melanoma-specific antigen A3
MART-1	melanomový antigen rozpoznávaný T buňkami 1 (melanoma antigen recognized by T cells 1)
mDC	zralé DC (mature DC)
MFI	průměrná intenzita fluorescence (mean fluorescence intensity)
MHC	hlavní histokompatibilní komplex (major histocompatibility complex)
mTOR	mammalian target of rapamycin
NF-κB	nuclear factor-kappa B
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NK	přírození zabíječi (natural killer cells)
NKT	NK T lymfocyty (natural killer T cells)
NSCLC	nemalobuněčný karcinom plic (non-small cell lung cancer)
PAMP	molekulární struktury typické pro povrch patogenních mikroorganismů (pathogen-associated molecular patterns)
PBMC	mononukleární buňky periferní krve (peripheral blood mononuclear cells)
PBS	fosfátový pufr (phosphate-buffered saline)
PD-1	protein programované buněčné smrti 1 (programmed cell death 1)
PD-L1	ligand programované buněčné smrti 1 (programmed death ligand 1)
PD-L2	ligand programované buněčné smrti 2 (programmed death ligand 1)
PI3K	fosfatidylinositol-3-kináza (phosphoinositide 3-kinase)
PLCγ1	fosfolipáza C gamma 1 (phospholipase C gamma 1)
Poly:IC	polyinozinová:polycytidylová kyselina (polyinosinic:polycytidylic acid)
PRR	receptory rozpoznávající konzervované molekuly typické pro patogeny (pattern recognition receptors)
PS	fosfatidylserin (phosphatidylserine)
PSA	prostatický specifický antigen (prostate-specific antigen)
R848	resiquimod
RCC	karcinom ledviny (renal cell carcinoma)
RT	pokožová teplota (room temperature)
SD	směrodatná odchylka (standard deviation)
SH2	Src-homology 2 domain
TCR	T buněčný receptor (T cell receptor)
TGF-β	transformující růstový faktor β (transforming growth factor β)
Th	pomocné T lymfocyty (helper T cells)
TIL	tumor infiltrující lymfocyty (tumor-infiltrating lymphocytes)
TIM	T cell/transmembrane, immunoglobulin, and mucin
Tim-3	T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3
TLR	Toll-like receptor
TNF	tumor nekrotizující faktor (tumor necrosis factor)
Tr1	regulační T buňky typu 1 (type 1 regulatory T cells)
Treg	regulační T lymfocyty (regulatory T cells)
Y	tyrozin (tyrosine)

1 ÚVOD

Výskyt nádorových onemocnění a počet úmrtí v jejich důsledku se celosvětově stále zvyšuje (Noone AM, 2018; Siegel et al., 2018). Příčinou rozvoje malignit je stárnutí a růst populace, stejně tak jako změny v prevalenci a distribuci hlavních rizikových faktorů, z nichž některé jsou spojeny se socioekonomickým vývojem. Počet pacientů přežívajících nádorová onemocnění neustále roste díky pokrokům v diagnostické a léčebné oblasti (Galluzzi et al., 2014). V pokročilejších stádiích onemocnění či v jejich metastatické formě tradiční způsoby léčby obvykle již nefungují. V těchto případech se jako poslední léčebná modalita nabízí imunoterapie, která využívá imunitní systém hostitele k rozpoznání a eliminaci nádorových buněk (Arruebo et al., 2011). Rozvoj oblasti imunoterapie nastal zejména s objevem léčby pomocí inhibitorů kontrolních bodů, jakož i díky pokrokům v technologiích využívajících geneticky modifikované buňky imunitního systému. Imunoterapie se tak stala významně se rozvíjející léčebnou metodou nádorových onemocnění, doprovázející klasické terapeutické postupy u vybraných malignit. Adoptivní buněčná imunoterapie (ACI, z angl. adoptive cell immunotherapy) je metodou protinádorové imunoterapie, která využívá *ex vivo* upravené lymfocyty k terapeutickým účelům. Schopnost aktivace a expanze lymfocytů v *in vitro* podmínkách bez působení endogenních inhibičních faktorů umožňuje generovat buňky s požadovanými protinádorovými vlastnostmi. Expandované lymfocyty mohou po podání zpět pacientovi dále proliferovat *in vivo* a přitom si zachovávat své protinádorové vlastnosti (Rosenberg and Restifo, 2015). I přes prokazatelné terapeutické účinky je tento druh léčby účinný pouze u malé části pacientů. Příčinou mohou být různé mechanismy vzniku imunitní rezistence k ACI. Jedním z mechanismů rezistence je vliv imunosupresivního nádorového mikroprostředí na fenotyp *in vitro* expandovaných lymfocytů. Schopnost aktivace lymfocytů pak může být ovlivněna expresí povrchových molekul, jako je například inhibiční molekula Tim-3. Tim-3 hraje důležitou roli ve „vyčerpání“ T buněk, čímž inhibuje účinnou protinádorovou imunitní odpověď (Avery et al., 2018). Terapie zaměřující se na Tim-3 by tak mohla představovat slibný přístup pro protinádorovou imunoterapii.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Nádorová onemocnění

V roce 2018 bylo celosvětově odhadováno okolo 18,1 milionů nových případů nádorových onemocnění (s výjimkou nemelanomového karcinomu kůže). Častěji byli postiženi muži (v 9,5 milionech případů) a v důsledku nádorových onemocnění bylo zaznamenáno okolo 9,6 milionů úmrtí. S tímto globálním nárůstem výskytu nádorových onemocnění je jeho prevence a léčba jedním z nejvýznamnějších témat veřejného zdravotnictví 21. století (Bray et al., 2018).

Nejčastěji se vyskytujícím nádorovým onemocněním je karcinom plic (Siegel et al., 2018). Skoro se stejnou četností se vyskytuje také karcinom prsu, který je u žen nejčastějším typem nádoru s nejvyšší úmrtností. Dále následuje karcinom prostaty u mužů a kolorektální karcinom (Siegel et al., 2018). U karcinomu plic je zároveň zaznamenána i nejvyšší úmrtnost (18,4 % případů) z celkového počtu úmrtí na nádorová onemocnění. Po něm následuje kolorektální karcinom, karcinom žaludku a jater (Bray et al., 2018). Zatížení na jednotlivé typy nádorových onemocnění se však v jednotlivých zemích a v jednotlivých oblastech podstatně liší v závislosti na stupni hospodářského rozvoje a souvisejících faktorech sociálního a životního stylu (Bray et al., 2018). Například Evropa tvoří 6 % světové populace, avšak zaujímá 25% podíl na globálním zatížení nádorovým onemocněním (Ferlay et al., 2018). V roce 2018 bylo v Evropě odhadováno 3,91 milionů nových případů malignit (s výjimkou nemelanomového karcinomu kůže) a 1,93 milionů úmrtí v důsledku tohoto onemocnění. Největší počet nových případů nádorových onemocnění v Evropě byl zaznamenán u nádorů prsu, kolorektálního karcinomu, karcinomu plic a prostaty. Tyto čtyři druhy nádorů představují polovinu případů všech nádorů v Evropě. Největší úmrtnost byla v Evropě zaznamenána v důsledku karcinomu plic, kolorektálního karcinomu, karcinomu prsu a pankreatu (Ferlay et al., 2018).

2.2 Tradiční způsoby léčby nádorových onemocnění

Tradiční způsob léčby nádorových onemocnění stojí na třech základních pilířích, které představuje léčba chirurgická, chemoterapie a radioterapie. Mezi tyto základní pilíře léčby je rovněž řazena i hormonální a biologická léčba (Abdulkareem and Zurmi, 2012; Arruebo et al., 2011; Lepor and Shore, 2012).

2.2.1 Chirurgická onkologie, chemoterapie a radioterapie

Nejpůvodnější a základní metodu léčby nádorových onemocnění představuje chirurgické odstranění nádoru, které má úspěšnost u značného počtu pacientů zejména v časném stadiu. Včasné odstranění nebo alespoň částečná eliminace nádorové masy pak bývá předpokladem k vyléčení onemocnění. Protože se nádor šíří infiltrativně, je při radikální operaci kromě nádoru odstraněno i dostatečné množství okolní tkáně, kam by mohly prorůst mikroskopické nádorové výběžky (Alieva et al., 2018). Existují však typy nádorů, u nichž není chirurgické odstranění možné. Jedná se zejména o nádory hematologické a například některé nádory dělohy, pokročilejší formy nádorů prostaty nebo choriokarcinom, které lze léčit jinými způsoby (Denmeade and Isaacs, 2002; Hanna and Soper, 2010; Voliotis and Diehl, 2002). Nevýhodou této terapie jsou také možné komplikace během a po chirurgickém zákroku a možnost využití pouze u dobře lokalizovaných nádorů (Alieva et al., 2018).

Chemoterapie je léčebná metoda, která využívá definované chemické látky cílicí na DNA, RNA a proteiny buněk za účelem zastavení rychlé proliferace nádorových buněk. U nádorových rychle proliferujících buněk tak dochází k závažnému narušení buněčné homeostázy a ke spuštění programované buněčné smrti, apoptózy (Pecorino, 2005). Naproti tomu i vlasové folikuly, žaludeční epitel a hematopoetické buňky patří mezi rychle proliferující buňky. Ty jsou proto rovněž ovlivněny těmito léčivy, a to má za následek řadu vedlejších účinků, jako je alopecie, poškození zažívacího traktu a krvetvorby (Pecorino, 2005).

Léčebná metoda radioterapie využívá vysoké dávky radiace, která poškozuje DNA, což způsobí smrt nádorových buněk nebo alespoň zpomalí jejich růst. Následky poškození DNA se projevují několik dní až týdnů (Chen and Kuo, 2017). Existují dva hlavní typy radiační terapie, a to vnější (teleterapie) nebo vnitřní (brachyterapie). Brachyterapie je lokální léčba, která cílí pouze na určité místo v těle. Je využívána například pro léčbu nádorů hlavy a krku, prsu, děložního čípku nebo prostaty (Skowronek, 2017). Častější teleterapie naproti tomu zasahuje větší část těla a je používána například pro léčbu kostních metastáz (Silberstein, 2005) nebo nádorů oka (Stockham et al., 2013). Radioterapie může pro některé pacienty představovat jedinou potřebnou léčbu, obvykle je však kombinována s dalšími typy léčby, jako jsou chirurgické odstranění nádoru, chemoterapie nebo imunoterapie (Maas et al., 2007).

2.2.2 Hormonální a biologická léčba nádorových onemocnění

Hormonální terapie je léčba zpomalující nebo zastavující růst nádorů, které potřebují ke svému růstu hormony (Abdulkareem and Zurmi, 2012). Hormonální terapie se dělí do dvou skupin. První blokuje produkci hormonů, druhá zasahuje do chování těchto hormonů v těle (Lepor and Shore, 2012; Sharifi et al., 2005). Vlivem této terapie může dojít ke zmenšení nádoru ještě před jeho chirurgickým odstraněním v rámci tzv. neo-adjuvantní terapie (Macaskill et al., 2006), a může rovněž snižovat riziko návratu nemoci po hlavní léčbě v rámci tzv. adjuvantní terapie (Murphy et al., 2012). Hormonální terapie se rutinně používá k léčbě hormonálně dependentního karcinomu prostaty (Labrie, 2010) a prsu (Awan and Esfahani, 2018). Nevýhodou je řada vedlejších účinků (Abdulkareem and Zurmi, 2012).

Biologická léčba (nebo také cílená léčba) je druh léčby cílicí na změny v nádorových buňkách, které jim pomáhají růst, proliferovat a šířit se (Padma, 2015). Většina těchto terapií je založena buď na léčivech nízkomolekulárních, jako jsou například syntetické inhibitory signálních molekul (Gatzka, 2018), nebo na léčivech vysokomolekulárních, jako jsou monoklonální protilátky (Scott et al., 2012). Cílená léčba se zaměřuje buď na samotné nádorové buňky, nebo na buňky, které podporují jejich růst (Padma, 2015). Léčba, která se zaměřuje na nádorové buňky, často cílí na signální molekuly, které kontrolují buněčné dělení (Croce et al., 2016), nebo přímo na samotné buňky. V takovém případě například protilátky specificky rozeznávající nádorové antigeny zajistí specifické nasměrování cytotoxických agens do blízkosti či přímo dovnitř nádorové buňky, tzv. antibody drug conjugates (Lambert and Berkenblit, 2018). Léčba, která cílí na buňky podporující růst nádorových buněk, je například zaměřena na inhibici tvorby krevních cév, angiogenezi (Lin et al., 2016).

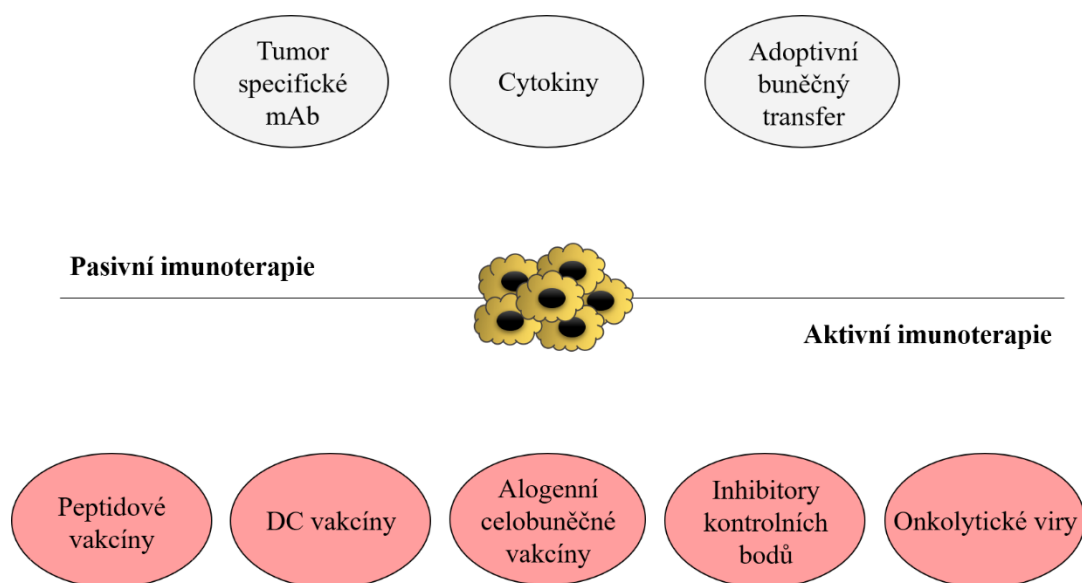
2.3 Imunoterapie nádorových onemocnění

Většina pacientů s nádorovým onemocněním je léčena kombinací chirurgie, ozařování a/nebo chemoterapie. Zatímco primární nádory mohou být ve většině případů účinně léčeny kombinací těchto tradičních přístupů, diseminaci nádorových buněk a jejich metastatickému šíření často nezabrání. V pokročilejších stádiích onemocnění či v jejich metastatické formě tradiční léčebné metody již obvykle nefungují. V těchto případech se může uplatnit také imunoterapie (Arruebo et al., 2011).

Nádorová imunoterapie představuje nejmladší pilíř léčby nádorových onemocnění, a to i přesto, že historie samotné imunoterapie sahá již do konce 19. století. Myšlenku zapojení

pacientova vlastního imunitního systému do boje proti nádorům poprvé formuloval Dr. William Coley, který v roce 1891 vyvinul první známou imunoterapeutickou strategii spočívající v očkování pacientů postižených sarkomy pomocí bakterií, které stimulovaly protinádorovou odpověď (McCarthy, 2006). Tato strategie vytvořila základ pro zkoumání interakcí mezi imunitními obrannými mechanismy a maligními buňkami (Dine et al., 2017). Imunoterapie jako léčebná metoda byla ještě donedávna vnímána velkou částí odborné veřejnosti skepticky, ba některými dokonce i zavrhována jako léčebná metoda vůbec. Tento přístup se však v posledních letech dramaticky změnil po zavedení léčby na bázi inhibitorů kontrolních bodů (tzv. checkpoint inhibitorů), za jejichž zavedení a pochopení jejich působení v roce 2018 obdrželi James Allison and Tasuku Honjo Nobelovu cenu za medicínu (Rotte et al., 2018).

Na rozdíl od tradičních léčebných přístupů, které se zaměřují na eliminaci nádorových buněk, nádorová imunoterapie cílí na imunitní systém za účelem jeho využití proti nádorovému onemocnění (Ventola, 2017). Protinádorová imunoterapie může být zprostředkována cestou aktivní či pasivní léčby na základě schopnosti (re)aktivovat imunitní systém proti maligním buňkám (Obr. 1). Aktivní imunoterapie je založena na podávání upravených antigenních produktů ve formě tzv. protinádorových vakcín, obvykle v kombinaci s inhibitory kontrolních bodů (Papaioannou et al., 2016). Při aktivní imunoterapii se očekává vznik imunologické paměti (Baxter, 2014). Pasivní imunoterapie je naproti tomu založena na opakované aplikaci velkého množství nádorově specifických buněk či protilátek a nepředpokládá se u ní vyvinutí imunologické paměti (Schuster et al., 2006). Obě terapie mohou být založeny na buněčném či nebuněčném základu.



Obrázek 1: Klasifikace přístupů protinádorové imunoterapie na aktivní a pasivní léčbu. Pasivní imunoterapie zahrnuje použití nádorově specifických mAb, cytokinů a adoptivního buněčného transferu, zatímco aktivní imunoterapie využívá vakcíny peptidové, založené na dendritických buňkách nebo alogenní celobuněčné vakcíny, inhibitory kontrolních bodů a onkolytické viry.

2.3.1 Nebuněčná aktivní imunoterapie

Aktivní přístupy imunoterapie nádorových onemocnění jsou zaměřeny na indukci endogenní, dlouhodobé antigenně specifické imunitní odpovědi (Cannon et al., 2019; Zhan et al., 2012). Pro specifickou vakcinaci se používají definované nádorové antigeny nebo materiál získaný biopsií nádoru. Imunitní odpověď proti nádoru může být dále zvýšena nespecifickou stimulací imunitního systému pomocí stimulátorů, jako jsou adjuvans nebo modifikátory biologické odpovědi, například cytokiny (Schuster et al., 2006).

2.3.1.1 Protinádorové vakcíny

Existují dvě kategorie protinádorových vakcín, a to vakcíny preventivní a terapeutické. Preventivní vakcíny jsou využívány k prevenci vzniku nádorů vyvolaných mikroorganismy, jako jsou kmeny lidského papilomaviru, které přispívají k rozvoji nádorů hlavy a krku, nádorů

konečníku a děložního čípku. Jedná se o již schválené vakcíny Cervarix, Gardasil a Gardasil 9 (Yaddanapudi et al., 2013).

Mezi terapeutické vakcíny patří vakcíny na bázi peptidů, které sestávají z imunogenních epitopů z nádorových antigenů (Yaddanapudi et al., 2013). Původní peptidové vakcíny jako monoterapie prokázaly v klinických studiích omezenou účinnost kvůli úzkému spektru *in vivo* indukovaných imunitních reakcí (Mocellin et al., 2004). Nová generace protinádorových multipeptidových vakcín je založena na dlouhých či hybridních syntetických peptidech, které zahrnují epitopy rozeznávané jak cytotoxickými (CTL, z angl. cytotoxic T lymphocytes), tak i pomocnými lymfocyty (Th, z angl. T helper cells) (Ohtake et al., 2014). Ty se v kombinaci s jinými léčebnými postupy testují při léčbě karcinomu plic, pankreatu, žaludku, prostaty a prsu (Xiao et al., 2015).

2.3.1.2 Onkolytické viry

Imunoterapie využívající onkolytické viry je poměrně novou formou léčby nádorových onemocnění. Využívá nativní nebo geneticky modifikované nepatogenní virové kmeny k selektivnímu vstupu do nádorových buněk, ve kterých se tyto viry replikují a způsobují buněčnou lýzu (Marelli et al., 2018). Onkolytické viry indukují lokální antivirovou imunitu i systémovou, nádorově specifickou imunitu, která může zprostředkovat regresí tumoru u vzdálených neinfikovaných lézí (Dharmadhikari et al., 2015).

Díky pokrokům v genetickém inženýrství byly vytvořeny onkolytické viry vložením genů kódujících proteiny, které jsou schopné stimulovat imunitní systém. Nejznámější virus vytvořený tímto způsobem, a zatím jediný schválený ke klinickému použití, je T-Vec (Franke et al., 2019). Jedná se o herpes simplex virus 1 modifikovaný lidským genem pro faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (GM-CSF, z angl. granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), který zvyšuje počet dendritických buněk (DC, z angl. dendritic cells) pocházejících z monocytů (Marelli et al., 2018). Následkem toho se předpokládá zvýšená antigenní prezentace DC, které stimulují cytotoxické CD8⁺ T lymfocyty (Conry et al., 2018). Vzhledem ke slibným terapeutickým účinkům byly pro přenos tohoto genu modifikovány další viry, jako je virus Vaccinia (Parviainen et al., 2015), a také byly vyvinuty další strategie zahrnující interleukiny (IL) pro zvýšení imunitní odpovědi; IL-2 byl použit pro aktivaci T lymfocytů (Hu et al., 2016) a IL-12, IL-15 a IL-18 byly použity pro aktivaci jak T, tak NK buněk (z angl. natural killer cells) (Choi et al., 2011; Stephenson et al., 2012;

Varghese et al., 2006). Byly testovány také další interleukiny, jako je IL-4 (u adenoviru), avšak s neuspokojivými výsledky z hlediska bezpečnosti (Post et al., 2007). Kromě cytokinů byly použity také chemokiny. Nejslibnější výsledky byly získány inzercí CCL5 a CCL3 do adenoviru (Lapteva et al., 2009). Tyto chemokiny mohou atrahovat T buňky a DC do místa nádoru (Castellino et al., 2006; Edukulla et al., 2009; Lapteva et al., 2009). Vložení určitého cytokinu do viru tedy může přitahovat specifickou imunitní populaci do místa nádoru, což podporuje zabíjení nádorových buněk a eliminaci nádorového imunosupresivního mikroprostředí (Marelli et al., 2018).

Několik součástí vrozené a adaptivní imunity omezuje účinnost terapie onkolytickými viry, protože mohou neutralizovat virové částice ještě před dosažením neoplastických lézí. To platí zejména pro mononukleární fagocytární systém jater a sleziny, který je schopen zachytit velké množství onkolytických virů po injekci (Bernt et al., 2003). Dále se jedná o komplementový systém (Ikeda et al., 2000), ke kterému jsou onkolytické viry zvláště citlivé, a neutralizační protilátky, které mohou existovat u pacientů již před terapií v důsledku jejich expozice přirozeně se vyskytujícím variantám virových kmenů běžně využívaných pro tyto účely (Fisher et al., 2001).

2.3.1.3 Inhibitory kontrolních bodů

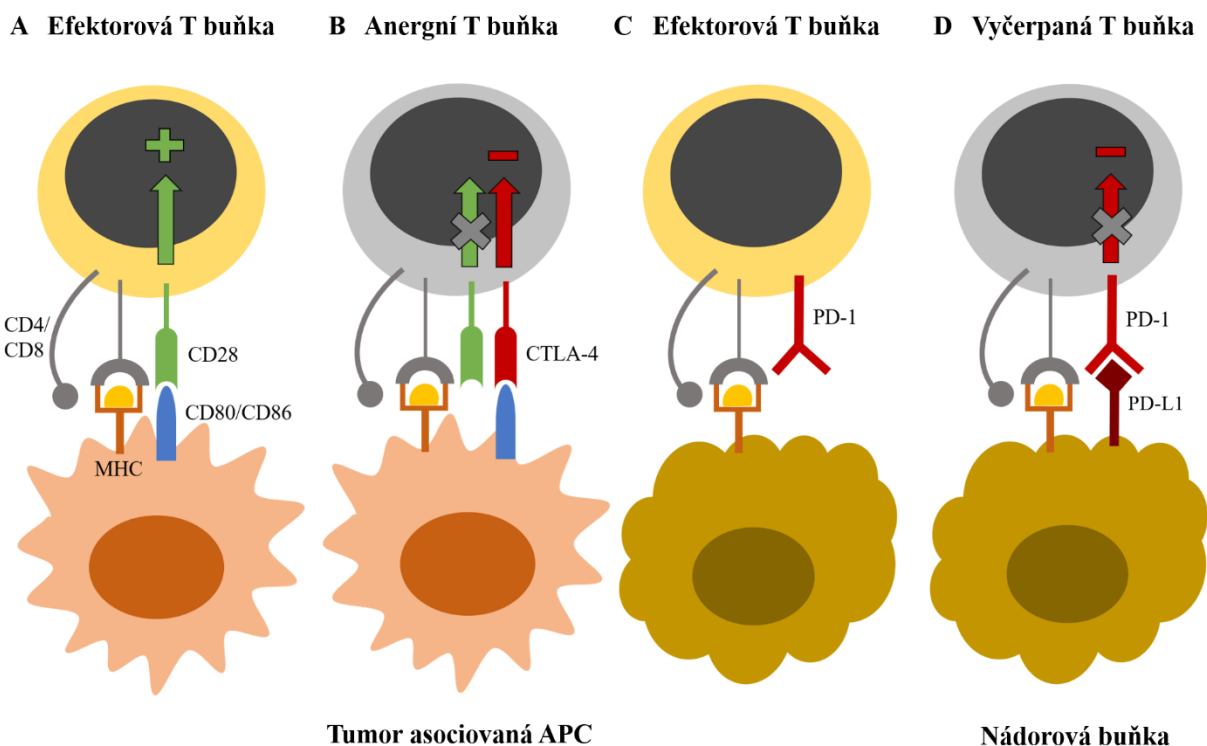
Blokace kontrolních imunitních bodů je velmi slibný přístup, jak aktivovat protinádorovou imunitní odpověď. Právě tento přístup způsobil, že se imunoterapie stala dalším pilířem nádorové terapie (Smyth, 2017). Termín imunitní kontrolní bod (checkpoint) je označení pro ligand-receptorové páry, které vykazují inhibiční nebo stimulační účinky na průběh imunitních reakcí (Hargadon et al., 2018). Tyto kontrolní body se účastní velkého množství inhibičních signalizací, které jsou klíčové pro udržení tolerance vůči vlastním tkáním a modulaci fyziologické imunitní odpovědi, což minimalizuje kolaterální poškození tkání (Eagar et al., 2002; Park et al., 2010). Je zřejmé, že nádory využívají některé signální dráhy imunitních kontrolních bodů jako hlavní mechanismy imunitní rezistence, zejména proti T buňkám specifickým proti nádorovým antigenům (Hargadon et al., 2018). Protože mnoho imunitních kontrolních bodů je iniciováno interakcí receptor-ligand, mohou být snadno blokovány protilátkami nebo modulovány rekombinantními formami ligandů či receptorů (Pardoll, 2012).

Jako inhibitory kontrolních bodů jsou využívány protilátky, které blokují receptory imunitních kontrolních bodů, čímž zamezí jejich nechtěné aktivaci a spuštění inhibice imunitní odpovědi (Hui, 2019). Důsledkem této blokace je podpoření již existující imunitní odpovědi proti nádorovým buňkám, jejímiž hlavními cíli jsou neoantigeny přítomné v nádorových buňkách jako výsledek somatických mutací (Yi et al., 2018). Nejznámějším inhibičním receptorem je antigen asociovaný s cytotoxickými T lymfocyty 4 (CTLA-4, z angl. cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) a receptor programované buněčné smrti 1 (PD-1, z angl. programmed cell death 1).

CTLA-4 a PD-1

CTLA-4 a PD-1 jsou v současné době jedny z nejznámějších a nejvíce studovaných inhibičních receptorů. Inhibiční molekula CTLA-4 je exprimována převážně na aktivovaných T buňkách (Brunet et al., 1987) a zabraňuje jejich přílišné aktivaci, čímž se významně podílí na udržování imunologické homeostázy (Tivol et al., 1995). Mimo to je tato molekula konstitutivně exprimována na regulačních T buňkách (Treg, z angl. regulatory T cells). Treg v nádorovém mikrostředí exprimují vyšší hladiny CTLA-4 než Treg na jiných místech (Simpson et al., 2013). CTLA-4 má vysokou homologii s CD28 a váže se na molekuly CD80/CD86 s vyšší afinitou než molekula CD28 (Linsley et al., 1994) a vytěsňuje CD28 vazbou na CD80/CD86 (Rudd et al., 2009).

PD-1 je členem CD28 rodiny receptorů (Riley and June, 2005) a je exprimován na povrchu aktivovaných CD4⁺ a CD8⁺ T lymfocytů, B lymfocytů, monocytů, DC a NK buněk (Keir et al., 2008). PD-1 má úlohu při aktivaci T buněk. Odpovídá na pozitivní signály skrze T buněčný receptor (TCR, z angl. T cell receptor) a CD28 účastí svých ligandů PD-L1 a PD-L2 (z angl. programmed death ligand 1, 2) (Jin et al., 2011). Signály skrze PD-1 dráhu přispívají k regulaci prvotní aktivace T buněk, regulaci jejich funkcí a toleranci a návratu k homeostáze imunitního systému. PD-1 je exprimován také na T buňkách během chronických virových infekcí (Barber et al., 2006) a u agresivních nádorů (Ahmadzadeh et al., 2009). Exprese ligandů PD-1 se zvyšuje v závislosti na působení zánětlivých stimulů a signálních sítí, které jsou často aktivní v nádorovém mikrostředí, což vede k nadměrné expresi PD-L1 a PD-L2 (Garcia-Diaz et al., 2017).



Obrázek 2: Inhibiční receptory CTLA-4 a PD-1. (A) Kostimulace CD80/CD86 skrze CD28 poskytuje aktivační signál. (B) Koinhibiční receptor CTLA-4 se váže na CD80/CD86 s vyšší afinitou, vytěsňuje vazbu CD28 a způsobuje anergii T buněk. (C) Efektorová T buňka s protinádorovou aktivitou. (D) Vazba PD-L1 exprimovaného na nádorové buňce vyvolá signalizaci vedoucí k vyčerpání T buněk.

Inhibitory imunitních kontrolních bodů schválené pro léčbu nádorových onemocnění

V případě, že hlavním mechanismem obrany nádorů před imunitní odpovědí jsou aktivované dráhy stimulované inhibičními receptory, je blokáda imunitních kontrolních bodů účinnou strategií pro zlepšení efektorové aktivity protinádorových T buněk. Některé inhibitory kontrolních bodů byly schváleny Úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA, z angl. Food and Drug Administration) pro léčbu několika typů nádorů. Studie u myších modelů i nádorových pacientů prokázaly, že použití CTLA-4 blokační protilátky inhibuje supresi regulačních T buněk a podporuje efektorové funkce $CD4^+$ a $CD8^+$ T buněk (Peggs et al., 2009; Wei et al., 2017). Vzhledem k výsledkům klinické studie (Hodi et al., 2010) se ipilimumab stal prvním inhibitelem imunitního bodu schváleným FDA v roce 2011 pro léčbu melanomu, což znamenalo začátek nové éry protinádorové imunoterapie. Zkoumán je nadále

také pro léčbu dalších typů malignit, jako je například karcinom ledviny (RCC, z angl. renal cell carcinoma), nemalobuněčný karcinom plic (NSCLC, z angl. non-small cell lung cancer) či nádory prostaty (Topalian et al., 2015). Další, i když dosud neschválenou, CTLA-4 blokační protilátkou je plně humanizovaný IgG2 (z angl. immunoglobulin G), tremelimumab. Přestože její účinek v podobě monoterapie nebyl zatím potvrzen, je stále testována v celé řadě kombinací (Hargadon et al., 2018).

V roce 2014 FDA schválila plně humanizovanou monoklonální PD-1 blokační protilátku, nivolumab, pro použití již v první linii léčby (Mullard, 2015). Účinek nivolumabu byl poprvé prokázán u pacientů s neresekovatelným nebo metastatickým melanomem, u kterých docházelo k progresi onemocnění po léčbě ipilimumabem a BRAF inhibitory. U této léčby bylo zaznamenáno zlepšení objektivní odpovědi oproti chemoterapii (Weber et al., 2015). Bylo také prokázáno, že nivolumab vykazuje účinnost u širšího spektra malignit, což vedlo k jeho schválení jako terapie první nebo druhé linie pro další typy nádorových onemocnění, jako jsou například uroteliální karcinom, pokročilý hepatocelulární karcinom, NSCLC a karcinom skvamózních buněk hlavy a krku (Hargadon et al., 2018). Další používanou PD-1 blokační protilátkou je pembrolizumab, který byl schválen v roce 2014 jako alternativa k nivolumabu (Chuk et al., 2017). Kromě PD-1 blokačních protilátek byla v roce 2016 schválena první humanizovaná blokační monoklonální protilátka proti PD-L1, atezolizumab, která byla povolena pro léčbu metastatického uroteliálního karcinomu (Ning et al., 2017). O několik měsíců bylo její použití rozšířeno pro léčbu NSCLC (Weinstock et al., 2017).

Protože CTLA-4 a PD-1 regulují funkce T buněk odlišnými mechanismy, velké naděje se vkládají do kombinovaného působení těchto inhibitorů (Ribas and Wolchok, 2018). Kombinovaná léčba ipilimumabem a nivolumabem vedla u pacientů s metastatickým melanomem k nebyvalým odezvám (Rotte, 2019) a v roce 2015 byl tento léčebný režim poprvé schválen pro pacienty s metastatickým melanomem s mutací v genu BRAF (Tsai and Daud, 2015). Počátkem roku 2016 byla terapie schválena pro léčbu nádorů bez ohledu na mutaci BRAF (Hargadon et al., 2018).

Vedlejší cytotoxické účinky terapie využívající inhibitory imunitních kontrolních bodů

Problémem použití inhibitorů kontrolních bodů jsou jejich ne zcela ojedinělé vedlejší účinky. Jedním z nejčastějších vedlejších účinků blokády imunitních kontrolních bodů je imunologicky zprostředkovaná kolitida a průjem, což v některých případech může vést až

k perforaci střev a úmrtí pacienta (Som et al., 2019). Podobný nežádoucí účinek byl pozorován i u pacientů léčených anti-PD-1 terapií (Eigentler et al., 2016). Postiženy bývají také játra, kůže či endokrinní regulace (Weber et al., 2017). Méně často bývá postižen systém centrální nervové soustavy a kardiovaskulární, plicní, muskuloskeletální a hematologické systémy (Postow et al., 2018). Většina toxických účinků je reverzibilních (Postow et al., 2018), kromě účinků na endokrinní systém, které mohou být trvalé (Myers, 2018). Úmrtí vyvolaná touto terapií nastávají nejčastěji v souvislosti s myokarditidou, pneumonitidou, kolitidou a neurologickými příhodami (Postow et al., 2018). Nežádoucí účinky související s terapií pomocí inhibitorů zpravidla vznikají během prvních několika týdnů až měsíců po zahájení léčby, ale mohou se projevit kdykoli, včetně doby po ukončení terapie, a mohou časem kolísat (Dine et al., 2017).

Výskyt nežádoucích imunitních účinků svědčí o tom, že blokáda imunitního kontrolního bodu aktivuje imunitní systém pacienta nespecifickým způsobem, tj. aktivovány jsou nejen cytotoxické buňky protinádorové, ale i autoreaktivní. Zda tato imunologická aktivace koreluje se zlepšenou protinádorovou imunitou zůstává neobjasněno. Některé studie však naznačují, že pacienti s imunitními nežádoucími účinky mají vyšší míru odpovědi než pacienti bez těchto vedlejších účinků (Attia et al., 2005; Weber et al., 2017).

Většina nežádoucích účinků souvisejících s autoimunitními projevy se dá léčit podáváním imunosupresiv, jako jsou glukokortikoidy nebo další imunosupresivní látky (Postow et al., 2018).

2.3.2 Nebuněčná pasivní imunoterapie

Nebuněčná pasivní protinádorová imunoterapie vykazuje specifickou odpověď proti nádorovým antigenům díky opakovanému podávání velkého množství efektorových molekul, kterými jsou nádorově specifické protilátky či jiné působky (Schuster et al., 2006). Protilátky, jako složky humorálního imunitního systému, rozpoznávají antigenní struktury a neutralizují je. Mohou také zprostředkovávat efektorové funkce, jako jsou buněčná cytotoxicita závislá na protilátkách (ADCC, z angl. antibody-dependent cellular cytotoxicity) a / nebo cytotoxicita závislá na komplementu (CDC, z angl. complement-dependent cytotoxicity) (Ochoa et al., 2017). Současným cílem je zvýšit účinnost podávaných protilátek s ohledem na ADCC a CDC (Schuster et al., 2005).

2.3.2.1 Nádorově specifické monoklonální protilátky

Monoklonální protilátky (mAb) jsou nejlépe charakterizovanou a pravděpodobně také nejrozšířenější formou imunoterapie v klinické praxi. Nejrozšířenější a nejúčinnější mAb je protilátka proti CD20 (rituximab) u hematologických malignit z B řady a trastuzumab (Herceptin), protilátka proti epitelálnímu růstovému faktoru HER2, který je silně exprimován zejména u karcinomu prsu (Arruebo et al., 2011).

Monoklonální protilátky selektivně rozpoznávají a vážou se na epitopy nádorových buněk na základě exprese nádorových antigenů, které jsou vysoce exprimovány maligními buňkami a v menší míře buňkami nemaligními. (Ventola, 2017)

2.3.2.2 Imunomodulační cytokiny

Cytokiny jsou přirozenými modulátory imunitní odpovědi a jsou produkovány mnoha typy buněk. Jedná se o malé proteiny s proměnlivými funkcemi, kterými jsou zejména regulace zánětu a imunity. Cytokiny mohou vést ke zvýšení nebo naopak útlumu imunitní odpovědi. Rovnováha jejich stimulačních a inhibičních vlastností je pak rozhodující pro antimikrobiální i protinádorovou imunitu (Banchereau et al., 2012). Cytokiny mohou být klasifikovány na základě jejich strukturní homologie nebo funkčních aktivit. I když je v současné době zkoumáno mnoho cytokinů pro protinádorovou imunoterapii, doposud je nejlépe charakterizován IL-2 a interferon- α (IFN- α) (Berraondo et al., 2019). Podávání většiny imunostimulačních cytokinů pacientům s nádorovým onemocněním jako samostatné terapeutické intervence je obecně spojeno s malou, pokud vůbec nějakou, klinickou aktivitou (Galluzzi et al., 2014). Jako monoterapie jsou také často spojeny s těžkou toxicitou (Waldmann, 2018). Jsou proto studovány v kombinaci s jinými přístupy, jako je terapie pomocí inhibitorů kontrolních bodů, nádorově specifickými protilátkami pro zvýšení ADCC těchto protilátek nebo v kombinaci se stimulačními protilátkami (Waldmann, 2018). Imunostimulační cytokiny se obecně používají jako adjuvans pro jiná protinádorová imunoterapeutika, a to buď jako rekombinantní molekuly, nebo kódované v expresních vektorech. Výjimku představuje IFN- α 2b a IL-2. IFN- α 2b je v současné době schválen FDA a Evropskou lékovou agenturou (EMA, z angl. European Medicines Agency) pro léčbu leukemie vlasatých buněk (HCL, z angl. hairy cell leukemia), s AIDS souvisejícího Kaposiho sarkomu, folikulárního lymfomu, mnohočetného myelomu, melanomu, vnějších genitálních bradavic a cervikálních intraepiteliálních novotvarů (Galluzzi et al., 2014). IL-2 je schválen

pro léčbu metastatického melanomu a RCC (Jiang et al., 2016). Kromě toho IFN- α 2a je povolen pro použití u pacientů s HCL a chronickou myeloidní leukemií a v Evropě rovněž pro léčbu melanomu (Galluzzi et al., 2014).

2.4 Buněčná imunoterapie nádorových onemocnění

Buněčná imunoterapie nádorových onemocnění je metoda, která využívá *ex vivo* upravené imunitní buňky k léčebným účelům. Buněčná imunoterapie se dělí na aktivní a pasivní. Při aktivní buněčné imunoterapii jsou používány buňky, které po transferu pacientovi navozují dlouhodobou imunitní odpověď na nádorové onemocnění (Murphy, 2010). Mezi takové buňky patří například dendritické buňky (Papaioannou et al., 2016). Imunoterapie na bázi DC typicky zahrnuje kultivaci *ex vivo* připravených pacientových DC s vhodným zdrojem tumor asociovaných antigenů a současnou stimulaci DC maturačními činidly. Po podání takto upravených DC pacientovi je očekávána (re)aktivace nádorově specifických T buněk (Garg et al., 2017). Při pasivní adoptivní buněčné imunoterapii jsou používány buňky, které po transferu nevytváří dlouhodobou imunitní paměť, ale jsou schopny přímo rozeznávat a eliminovat nádorové buňky (Murphy, 2010). Pro přetrvávající léčebný účinek je však nutné tyto buňky pacientovi podávat opakovaně. Mezi buňky s pasivním terapeutickým účinkem patří T nebo NK buňky (Schuster et al., 2006). Efekt pasivní buněčné imunoterapie je zprostředkován na základě protinádorových vlastností lymfocytů, které jsou obvykle získávány z periferní krve nebo ze samotné nádorové tkáně pacienta (Rosenberg and Restifo, 2015). Pouze malé množství buněk s požadovanou protinádorovou specifitou může být expandováno *in vitro* do velkého počtu ($>10^{10}$ buněk). Expandované lymfocyty mohou po podání zpět pacientovi dále proliferovat *in vivo* a zachovávat si své protinádorové vlastnosti (Rosenberg and Restifo, 2015). Cílem této strategie je prolomit toleranci vůči nádorovým antigenům a produkovat velké množství T buněk s vysokou aviditou k nádorovým antigenům (Rosenberg and Restifo, 2015).

2.4.1 Dendritické buňky

Dendritické buňky byly poprvé popsány Ralphem Steinmanem a Zanvilem Cohnem, kteří identifikovali jejich klíčovou roli v indukci adaptivní imunitní odpovědi (Steinman and Cohn, 1973). DC tak byly označeny jako „přírodní adjuvans“ a nejúčinnější antigen prezentující

buňky. DC dokáží účinně pohltnout a zpracovat antigen, prezentovat jej T buňkám a exprimovat velké množství kostimulačních a koinhibičních molekul, které podmiňují imunitní aktivaci nebo anergii (Steinman, 2012). DC mohou také produkovat velké množství cytokinů zapojených do obrany hostitele proti patogenům, jako jsou IL-12 a interferony. DC také aktivují NK a NKT buňky (z angl. natural killer T cells), které rychle zabíjí patogeny a produkují důležité cytokiny (Mellman and Steinman, 2001). DC běžně zachycují antigeny, proti kterým obvykle nevzniká imunita, ale tolerance. Patří mezi ně proteiny vyskytující se v dýchacích a trávicích cestách (Vermaelen et al., 2001) a antigeny pocházející z vlastních obměňujících se tkání. Prezentace antigenů v klidovém stavu, tedy v nepřítomnosti patogenů, umožňuje DC kontrolovat toleranci vůči vlastním tkáním (Huang et al., 2000).

V organismu existují DC ve dvou funkčních a morfologických stavech, označovaných jako zralé a nezralé DC. V klidovém stavu jsou DC považovány za nezralé, s vysokou schopností pohlcovat antigeny *in situ* prostřednictvím různých receptorů a mechanismů (Mellman and Steinman, 2001). DC získávají antigeny prostřednictvím fagocytózy, mikro nebo makropinocytózy a endocytózy pomocí Fc receptorů (CD64 nebo CD32), integrinů ($\alpha\beta3$ nebo $\alpha\beta5$), lektinových receptorů C typu, včetně manózoového receptoru a DEC-205, nebo scavengerových receptorů (Sabado et al., 2017). Po setkání s aktivními podněty podstoupí DC řadu fenotypových a funkčních změn, označovaných jako aktivace a maturace (Reis e Sousa, 2006). Jedná se o komplexní proces sestávající ze tří základních vlastností; zpracování a prezentace antigenu, migrace a stimulace T buněk (Mellman and Steinman, 2001).

2.4.1.1 Nezralé dendritické buňky

Nezralé DC jsou charakterizovány nízkou povrchovou expresí molekul hlavního histokompatibilního komplexu I. a II. třídy (MHC, z angl. major histocompatibility complex) a kostimulačních molekul (např. CD80, CD86, CD40) (Sabado et al., 2017). Nezralé DC vykazují stálou endocytickou aktivitu, a proto kontinuálně prezentují T buňkám antigeny vlastních tkání. V tomto případě jsou T buňky polarizovány směrem k toleranci nebo imunosupresi (Steinman and Swanson, 1995). Tato tolerance je aktivně indukována a udržována imunitními kontrolními body a absencí stimulačních signálů DC. Interakce CTLA-4 nebo PD-1 s ligandy DC způsobují anergii T buněk nebo diferenciaci

imunosupresivních T buněk, jako jsou Treg (Pardoll, 2012). Treg dále pomáhají šířit toleranci vůči vlastním antigenům (Dudek et al., 2013).

2.4.1.2 *Maturace dendritických buněk*

Po aktivaci infekcí nebo vakcinací prochází DC procesem maturace, což jim umožňuje indukovat klonální expanzi antigenně specifických naivních T buněk a jejich diferenciaci na efektorové T buňky (Mellman and Steinman, 2001). Antigeny mohou být zpracovány na peptidy skrze endogenní dráhu pro prezentaci na MHC I CD8⁺ T buňkám nebo skrze exogenní dráhu pro prezentaci na MHC II CD4⁺ T buňkám. Alternativně jsou DC schopny zkřížené prezentace extracelulárních antigenů v komplexu s molekulami MHC I. třídy CD8⁺ T buňkám (Bevan, 2006). Byly popsány dvě hlavní dráhy zkřížené prezentace; cytosolická dráha, kdy dochází ke zpracování antigenu v cytosolu, a vakuolární dráha, kdy dochází ke zpracování antigenu v endocytických kompartmentech (Joffre et al., 2012). Tento proces je nezbytný pro indukci imunitní odpovědi proti většině nádorů a některým virům (Heath and Carbone, 2001). DC jsou schopny zpracovat také lipidové antigeny, prezentovat je na CD1d molekulách a aktivovat tak NKT buňky (Cohen et al., 2009).

Proces maturace je doprovázen dramatickou cytoplazmatickou reorganizací, spočívající v redistribuci MHC II. třídy z intracelulárních kompartmentů na plazmatickou membránu. Zvyšuje se také exprese kostimulačních, adhezivních a dalších molekul, jako například CD83 (Aerts-Toegaert et al., 2007). DC při procesu maturace prodlužují své cytoplazmatické výběžky, a tím zvyšují možnost interakce s T buňkami. DC také mění svůj profil chemokinových receptorů, které usnadňují jejich navádění do lymfatických orgánů (Mellman and Steinman, 2001).

Maturace DC je typicky spouštěna produkty patogenních mikroorganismů, jako jsou lipopolysacharid (LPS), CpG DNA nebo dsRNA (Dalod et al., 2014). DC jsou vybaveny širokou škálou lektinových receptorů, toll-like receptorů (TLR) a dalších receptorů rozpoznávajících konzervované molekuly typické pro patogeny (PRR, z angl. pattern recognition receptors) (Dzopalic et al., 2012). Maturace může být u DC navozena agonisty TLR. Jedná se například o LPS (agonista TLR4), polyinozinovou:polycytidylovou kyselinu [poly I:C (agonista TLR3)] nebo resiquimod [R848 (synteticky připravený agonista TLR 7/8)]. K maturaci rovněž přispívají prozánětlivé cytokiny tumor nekrotizující faktor α (TNF- α), IL-1 β a IL-6 a další působky, jako například prostaglandin E2 (Lee et al., 2002).

2.4.1.3 Imunoterapeutický potenciál dendritických buněk

Jedním ze způsobů, jak prolomit imunologickou toleranci k nádorovým antigenům, je aktivní buněčná imunoterapie na bázi *in vitro* připravených maturovaných DC (Schuster et al., 2006). Díky své schopnosti antigenní prezentace, modulaci ostatních imunitních buněk a funkční plasticitě představují DC vhodný imunoterapeutický nástroj. DC produkují cytokiny a chemokiny, které jsou klíčové pro diferenciaci $CD8^+$ T buněk na CTL a polarizaci $CD4^+$ T buněk na populace efektorových Th1, Th2, Th17 (Kaiko et al., 2008) nebo regulačních Treg, Th3, Tr1 (z angl. type 1 regulatory T cells) (Kastenmuller et al., 2011). Přítomnost cytokinů IL-12p70, IL-15 a IFN- α/β během antigenní prezentace $CD8^+$ T buňkám podporuje jejich expanzi, diferenciaci na CTL a reguluje vznik paměťových T buněk (Williams and Bevan, 2007). DC polarizují $CD4^+$ T buňky na Th1 typ prostřednictvím cytokinů IL-12p70, IL-18 a IL-27, zatímco na Th17 typ prostřednictvím transformujícího růstového faktoru β (TGF- β , z angl. transforming growth factor β) a IL-6, kdy zúčastněné jsou také IL-1b, IL-21 a IL-23 (Constantino et al., 2016). Pro vývoj Treg jsou kritické cytokiny IL-2, IL-10 a TGF- β a rovnováha mezi pozitivními a negativními kostimulačními signály (Josefowicz et al., 2012).

V klinické praxi jsou nejčastěji využívány populace DC diferencované *in vitro* z monocytů periferní krve, které jsou kultivovány v přítomnosti GM-CSF a IL-4 (Filley and Dey, 2017). Výhodou takto připravených DC je možnost jejich manipulace před podáním pacientovi. První terapeutickou vakcínou schválenou v roce 2010 FDA je sipuleucel-T, využívaný pro léčbu kastačně rezistentního karcinomu prostaty. Jedná se o vakcínu na bázi mononukleárních buněk, odebraných pacientovi v průběhu leukaferézy. Buňky jsou aktivovány *ex vivo* rekombinantním fúzním proteinem PAP2024 (sestavujícím z prostatického antigenu a prostatické kyselé fosfatázy fúzované s GM-CSF) a podány zpět pacientovi (Cheever and Higano, 2011). V současné době jsou vakcíny na bázi DC testovány v léčbě mnoha dalších nádorových onemocnění (Filley and Dey, 2017).

DC pro protinádorovou imunoterapii mohou být buď autologního nebo alogenního původu. Preferovány jsou autologní DC, avšak DC a prekurzory DC nádorových pacientů jsou ovlivňovány imunosupresivním mikroprostředím nádoru (Gabrilovich, 2004; Pinzon-Charry et al., 2005). Ukázalo se, že alogenní DC podporují protinádorovou imunitu díky alogenním MHC molekulám, které představují silné imunogenní signály (Florcken et al., 2013). Pro tento přístup není potřeba kompatibilita MHC mezi dárce a příjemcem, což dává možnost použití předem připravených zamrazených buněk. Alogenní DC se běžně získávají

diferenciací z mononukleárních buněk periferní krve (PBMC, z angl. peripheral blood mononuclear cells) zdravých dárců. Ve studii Laurell a kol. (Laurell et al., 2017) byly alogenní DC maturovány ligandy TLR a IFN- γ , a poté byly injikovány do nádorových lézí pacientů s metastatickým RCC. Studie ukázala, že intratumorální podání alogenních DC vedlo k indukci protinádorové reakce zprostředkované T buňkami. Ve studii bylo dále zjištěno, že intratumorální aplikace pre-aktivovaných alogenních DC vedla k náboru a aktivaci imunitních buněk v místě nádoru a že inkompatibilita MHC indukovala proces lokální rejekce v injikovaném místě. Výsledky studie ukázaly, že alogenní DC mohou sloužit jako významné buněčné adjuvans (Laurell et al., 2017).

2.4.2 T buňky

T buňky jsou využívány v pasivní adoptivní buněčné imunoterapii nádorových onemocnění. Jedná se o slibnou metodu imunoterapie, která využívá protinádorových vlastností lymfocytů k eradikaci primárních a metastatických nádorových buněk (Rosenberg and Restifo, 2015). Lymfocyty jsou nejprve izolovány z periferní krve pacientů, nádorových lymfatických uzlin nebo nádorových tkání (Shi et al., 2015). Pro léčbu stačí identifikovat pouze malé množství protinádorových buněk s požadovanými vlastnostmi, a ty pak mohou být expandovány *in vitro* do velkého počtu ($>10^{10}$ buněk) (Rosenberg and Restifo, 2015). *In vitro* testy lze určit přesné populace a efektorové funkce požadované pro regresi nádoru. Populace vhodných buněk mohou být poté selektovány pro expanzi (Rohaan et al., 2018). Buňky lze *in vitro* aktivovat v laboratoři bez endogenních inhibičních faktorů, proto mohou být indukovány tak, aby vykazovaly požadované protinádorové efektorové funkce. Klíčová je možnost manipulace pacienta (tzv. conditioning) před buněčným transferem k poskytnutí optimálního prostředí pro transferované buňky (Rosenberg and Restifo, 2015). *In vitro* expandované T buňky, schopné rozeznávat nádorové antigeny, jsou poté podány zpět pacientovi, často spolu s vhodnými růstovými faktory, které stimulují jejich přežívání a expanzi *in vivo* (Gattinoni et al., 2006). Během posledních dvou až tří desetiletí prokázala autologní terapie T buňkami svůj potenciál vyvolat dramatické klinické odpovědi a stala se aplikovatelnou terapeutickou modalitou (Rosenberg and Restifo, 2015), i když pro svoji výrobní náročnost málo využívanou.

Protinádorová aktivita ACI byla u lidí poprvé objevena Southamem a kol., kteří provedli subkutánní autotransplantaci pokročilého pevného nádoru s leukocyty a bez leukocytů.

Inhibice růstu nádoru byla pozorována u poloviny pacientů, kteří byli inokulováni jak nádorem, tak i leukocyty. Tato transplantace pomohla odhalit, že klíčovými efekty v protinádorové odpovědi jsou právě T buňky a že terapie T buňkami má potenciál vyvolat specifickou, hlubokou a přetrvávající odpověď (Southam et al., 1966). Imunoterapie na bázi ACI pak byla poprvé popsána v roce 1988 Stevenem Rosenbergem a kol., kdy bylo prokázáno, že tumor infiltrující lymfocyty melanomu expandované *in vitro* mohou zprostředkovat specifickou lýzu autologních nádorových buněk (Rosenberg et al., 1988). Důležitého pokroku ACI dosáhla v roce 2002 zavedením metody imunodepletujícího preparativního režimu (Wong et al., 2017). V současné době existují dvě hlavní strategie používané při ACI, a to použití nativních protinádorových T lymfocytů nebo použití lymfocytů upravených metodami genetického inženýrství tak, aby cílily na nádor.

2.4.2.1 Nativní T buňky s protinádorovou aktivitou

ACI na bázi nativních T buněk využívá jako zdroj těchto buněk takzvané tumor infiltrující lymfocyty (TIL; z angl. tumor-infiltrating lymphocytes) nebo, méně častěji, lymfocyty z periferní krve (Perica et al., 2015). TIL jsou izolovány z resekovaných metastatických ložisek nádorů a jsou již obohacené o nádorově specifické lymfocyty (Rohaan et al., 2018). Lymfocyty z periferní krve obohacené nejsou, a je proto nutné toto obohacení provést, například stimulací peptidů derivovaných z nádorových antigenů (Taborska et al., 2017). Izolované TIL či obohacené lymfocyty jsou dále expandovány *in vitro* a kultivovány v koktejlu různých cytokinů před samotným adoptivním transferem (Yang et al., 2013). Tento přístup se pokouší navrátit poškozenou funkční protinádorovou aktivitu T buňkám pacienta a díky *in vitro* extenzivní expanzi ji nadále zesílit (Gilham et al., 2015).

ACI se ukázala jako účinná léčba u pacientů s metastatickým melanomem (Merhavi-Shoham et al., 2017). Melanom tvoří jeden z nejvíce imunogenních nádorů a poskytuje tak vhodný studijní základ pro imunoterapii. U melanomu bylo poprvé objeveno, že je možné dosáhnout regrese nádoru pouze aktivací imunitního systému prostřednictvím IL-2, růstového faktoru T buněk (Lotze et al., 1986; Rosenberg et al., 1985). Po transferu expandovaných TIL pacientovi se obecně podává IL-2 v nízkých, středních nebo vysokých dávkách s cílem zvýšit proliferaci, přežití a efektorové funkce expandovaných buněk (Besser et al., 2015). Efektivní *in vitro* expanze TIL je stěžejní pro úspěšnou léčbu. Nejdůležitějším růstovým faktorem pro *in vitro* expanzi byl dlouho považován IL-2. Dnes se běžně používá také směs aktivačních

faktorů, obvykle podáváním CD3 (Goedegebuure et al., 1995) nebo CD28 (Baldan et al., 2015) specifických protilátek nebo alogenních buněk, například ozářených monocytů periferní krve od zdravých dárců (Forget et al., 2014).

2.4.2.2 Geneticky modifikované buňky

V mnoha případech není strategie využívající nativní T buňky možná, a to buď kvůli nedostatku biotického materiálu nebo absenci nádorově specifických T buněk. Proto byla vyvinuta strategie využívající genetických modifikací. K těmto modifikacím jsou využívány autologní T buňky periferní krve, které jsou *ex vivo* geneticky modifikovány tak, aby exprimovaly receptor, který rozeznává přímo nádorový antigen na povrchu nádorových buněk, či jeho část v rámci prezentovaných MHC molekul I. třídy (Wong et al., 2017). Genetické modifikace se obvykle provádí začleněním do virových vektorů, jako jsou retrovirové nebo lentivirové vektory umožňující trvalé modifikace začleněním do genomu hostitele (Durand and Cimorelli, 2011). Moderní genetické modifikace využívají například nevirovou metodu CRISPR (Mollanoori et al., 2018).

Existují dvě základní strategie, kterými geneticky modifikované lymfocyty rozeznávají nádorové antigeny. První strategie zahrnuje expresi α a β řetězců antigenně specifických TCR (Farkona et al., 2016). Výhoda této strategie spočívá ve schopnosti modifikovaných lymfocytů cílit na intracelulární nádorové antigeny, které jsou rozpoznány prostřednictvím jejich peptidů prezentovaných na MHC molekulách nádorových buněk (Hinrichs and Rosenberg, 2014). Genetická úprava TCR tedy umožňuje cílit na antigeny, které nejsou přirozeně rozeznávány. Tato terapie je tak potenciálně přístupná každému pacientovi, jehož nádor nese příbuznou alelu MHC a v rámci této alely prezentuje kýžený peptid nádorového antigenu, který je rozpoznán geneticky vneseným TCR (Hinrichs and Rosenberg, 2014). Limitací toho přístupu je však MHC restrikce, kdy cílové buňky musí mít neporušenou prezentaci daného nádorového antigenu a cílená populace musí sdílet konkrétní MHC alelu (Hinrichs and Rosenberg, 2014). Bohužel klinické použití těchto vysoce avidních TCR bylo spojeno s významnou sekundární destrukcí zdravých tkání, které exprimují stejný či podobný cílový antigen (Hinrichs and Rosenberg, 2014). První imunoterapie pomocí takto upravených TCR byla testována proti metastatickému melanomu a využit byl TCR, který vázal HLA-A2 alelu (z angl. human leukocyte antigen A2) melanocytárního diferenciačního antigenu (Morgan et al., 2006). Následně byl vyvinut TCR s vyšší aviditou cílící na epitop MART-1

(z angl. melanoma antigen recognized by T cells 1) s cílem dosáhnout lepšího rozpoznání maligních buněk s nižší expresí MART-1. Přestože byla prokázána zlepšená míra odezvy, zasaženy byly také normální melanocyty v kůži, oku a kochleji. Tato toxicita byla pozorována u více než poloviny léčených pacientů (Johnson et al., 2009). Neurotoxicita a kardiotoxicita byla spojena i s terapií pomocí lymfocytů namířených proti antigenu MAGE-A3 (z angl. melanoma-associated antigen 3) (Cameron et al., 2013; Morgan et al., 2013). Naopak při použití T buněk s TCR s vyšší afinitou k HLA-A2 restringovanému peptidu cílicího na antigeny NY-ESO-1 a LAGE-1 nebyla toxicita pozorována. T buňky navíc vykazovaly vyšší perzistenci, která korelovala s klinickou aktivitou proti myelomu pozitivnímu na tyto antigeny (Rapoport et al., 2015). Pokračující úsilí se zaměřuje na zvýšení účinnosti přenosu genů, navrhování strukturních modifikací TCR a identifikace cílových antigenů, které jsou vysoce selektivní převážně pro nádorové buňky (Farkona et al., 2016).

Druhá strategie je založena na chimerních antigenních receptorech (CAR, z angl. chimeric antigen receptors). CAR sestávají z variabilní imunoglobulinové domény (IgV) fúzované ke konstantní doméně TCR. V dnešní době je CAR obvykle složen ze specifického B buněčného receptoru, extracelulární antigen rozpoznávající domény, kterou většinou představuje jednořetězcový variabilní fragment protilátky, ale může se jednat také o peptid nebo protein, CD3ζ řetězec TCR a jednu či více intracelulárních kostimulačních domén (Fesnak et al., 2016). Extracelulární část CAR umožňuje rozpoznání specifického antigenu T buňkou a signální domény poté stimulují její proliferaci, cytotoxickou aktivitu a produkci cytokinů pro eliminaci cílové buňky. K přípravě se obvykle využívají pacientovy vlastní T buňky, což snižuje riziko reakce štěpu proti hostiteli (Jackson et al., 2016). Jelikož CAR rozeznávají antigenní epitopy na celých molekulách nádorových antigenů (Morgan et al., 2010), jejich užití tak překonává určitá omezení výše popsaných TCR. Skupiny vedené Kurosawou a Eshharem jako první prokázaly, že tyto typy syntetických receptorových molekul mohou rozpoznat cílový antigen nezávisle na MHC molekulách (Gross et al., 1989; Kuwana et al., 1987). Schopnost rozpoznávání CAR T buněk nezávisle na MHC restrikci jim poskytuje základní protinádorovou výhodu, protože jedním z mechanismů, kterým nádory unikají imunitnímu dohledu, je ztráta prezentace antigenu asociovaného na MHC nádorových buněk (Garrido et al., 2016). Hlavní nevýhodou CAR systému je naopak to, že rozpoznávání antigen musí být přítomen na povrchu buňky (Morgan et al., 2010), což snižuje repertoár nádorových antigenů, na které je možné pomocí CAR cílit. Jedna z dosud zaznamenaných úspěchů terapie na bázi CAR T buněk je léčba B buněčných malignit, u kterých CAR cílí na molekuly CD19 (Sermer and Brentjens, 2019). V průběhu let se terapie založená na CAR

T buňkách vyvíjela. V současné době existuje řada již čtyř generací těchto receptorů, které se liší svou kompozicí molekul a metodou vnášení do cílových buněk.

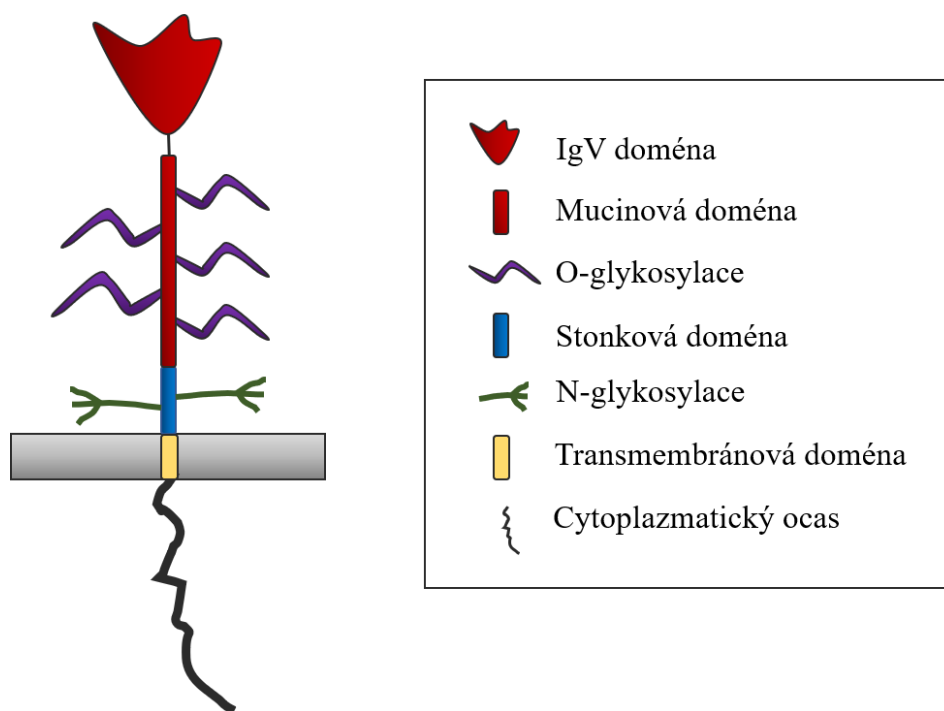
2.5 Rezistence k pasivní adoptivní T buněčné imunoterapii

Pasivní ACI v řadě studií ukázala nebývalou léčebnou účinnost u pacientů ve velmi pozdních stádiích onemocnění, kdy veškeré ostatní léčebné postupy již selhaly (Perica et al., 2015). Přes tyto nebývalé výsledky má však stále jen velmi malá část pacientů z této terapie prospěch (Perica et al., 2015). Důvodem selhání léčby je vznik rezistence. Mechanismy, kterými rezistence vzniká, závisí na typu užití léčebné metody. U geneticky modifikovaných buněk jsou nádorové buňky obvykle rozeznány skrze jeden nádorový antigen. Při ztrátě exprese tohoto antigenu během terapie se tato terapie stává neúčinnou (Landsberg et al., 2012). Dalším mechanismem rezistence je neschopnost imunitních buněk proniknout do samotného nádoru (Gajewski et al., 2006). Tento mechanismus je často příčinou selhání léčby u pevných nádorů (Gajewski et al., 2006). Významným prvkem rezistence nádorových onemocnění vůči pasivní ACI je rovněž i vliv mikroprostředí nádoru na fenotyp *in vitro* expandovaných lymfocytů. Toto mikroprostředí může ovlivnit expresi povrchových molekul, které ovlivňují schopnost aktivace lymfocytů po stimulaci příslušným antigenem. Mezi tyto molekuly patří i inhibiční receptor Tim-3 (z angl. T cell immunoglobulin and mucin domain 3).

2.5.1 Tim-3

Tim-3, známý také jako HAVCR2, je transmembránový protein typu I patřící do TIM rodiny (z angl. T cell immunoglobulin and mucin domain). Je tvořen IgV doménou, glykosylovanou mucinovou doménou s různou délkou v extracelulární části, transmembránovou doménou a C-koncovou cytoplazmatickou částí s konzervovaným tyrozinovým signalizačním motivem (Du et al., 2017) (Obr. 3). Poprvé byl popsán v roce 2002 jako molekula specificky exprimovaná na myších Th1 a CTL1 produkujících IFN- γ (Monney et al., 2002). Později byla exprese Tim-3 potvrzena také u lidských IFN- γ produkujících T buněk (Khademi et al., 2004). Tim-3 je mimo Th1 buněk exprimován také na

DC, monocytech (Anderson et al., 2007), žírných buňkách (Wiener et al., 2007), Treg, NK buňkách či TIL (Anderson et al., 2016).



Obrázek 3: Doménová struktura Tim-3.

2.5.1.1 Tim-3 ligandy

Pro Tim-3 jsou dosud známy čtyři ligandy, a to galektin-9 (Gal-9), carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 1 (CEACAM-1), high-mobility group protein B1 (HMGB1) a fosfatidylserin (PS).

Prvním identifikovaným ligandem byl Gal-9 (Zhu et al., 2005). Jedná se o rozpustný protein patřící do skupiny lektinů S typu (Wada and Kanwar, 1997). Obsahuje dvě tandemově spojené rozpoznávající sacharidové domény, které specificky rozpoznávají N-vázané sacharidové řetězce v Tim-3 IgV doméně. Interakce mezi Gal-9 a Tim-3 spouští buněčnou smrt u efektorových Th1 T buněk, čímž tlumí zánět tkáně. Bylo pozorováno, že tato interakce pak vede k inhibici například u autoimunitní, experimentálně navozené encefalomyelitidy (Zhu et al., 2005). Indukce buněčné smrti skrze Gal-9 byla prokázána také u Tim-3⁺CD8⁺ TIL u karcinomu tlustého střeva (Kang et al., 2015). Ne všechny interakce Gal-9/Tim-3 však mají za následek buněčnou smrt. Bylo zjištěno, že Gal-9 zvyšuje Tim-3 zprostředkovanou produkci

IFN- γ u NK buněk (Gleason et al., 2012). U lidské THP-1 buněčné linie pak tato interakce spouští PI3K-mTOR signalizaci, aniž by došlo k buněčné smrti (Prokhorov et al., 2015). Interakce Gal-9 a Tim-3 na monocytech a makrofázích může vést ke změnám v produkci cytokinů, které ovlivňují odpověď Th1 nebo Th17 díky změnám v produkci IL-12 a IL-23 (Ma et al., 2013).

CEACAM-1 je druhým známým ligandem Tim-3 a poskytuje Tim-3 inhibiční funkci (Huang et al., 2015). Koexprese CEACAM-1 je nutná pro glykosylaci a proteinovou stabilitu Tim-3. Závislost funkce Tim-3 na CEACAM-1 koexpresi je založena na cis-interakci mezi N-koncovými membránovými doménami těchto dvou proteinů. Trans-interakce CEACAM-1 a Tim-3 pak potlačuje funkci efektorových T buněk a je nutná pro udržení T buněčné tolerance (Huang et al., 2015). Galectin-9 a CEACAM-1 se vážou na různé oblasti v IgV doméně Tim-3 a interakce CEACAM-1/Tim-3 a Gal-9/Tim-3 vedou k podobné signalizaci, kdy Bat-3 (HLA-B associated transcript 3), inhibiční regulátor Tim-3 signální dráhy, je uvolněn ze svého vazebného místa na cytoplazmatickém konci Tim-3 (Rangachari et al., 2012). Tyto dva ligandy tedy mohou mít kooperativní účinky při regulaci Tim-3 signalizace.

HMGB1 je dalším známým ligandem Tim-3 (Chiba et al., 2012). HMGB1 patří mezi takzvané DAMP proteiny (z angl. danger/damage-associated molecular patterns), které snímají endogenní signály nebezpečí (Klune et al., 2008). HMGB1 může být uvolňován z aktivovaných DC a podporovat reakce T a B buněk (Li et al., 2013). HMGB1 hraje u DC roli v transportu nukleových kyselin do endozomálních váčků, což je klíčový krok k tomu, aby DC rozpoznaly stresové faktory nádorových buněk nebo molekulární struktury typické pro povrch patogenních mikroorganismů (PAMP, z angl. pathogen-associated molecular patterns) a vyvinuly tak ochrannou imunitní odpověď proti nádoru nebo patogenní infekci. DC v nádorovém mikroprostředí exprimují vyšší hladiny Tim-3, než je tomu u DC v normálních tkáních. Tim-3 se váže na HMGB1, a blokuje tak transport nukleových kyselin do endozomů, čímž potlačuje aktivaci vrozené imunitní odpovědi proti nádorovým nukleovým kyselinám a produkci prozánětlivých cytokinů (Chiba et al., 2012).

Posledním dosud známým ligandem Tim-3 je PS. PS je negativně nabitý fosfolipid, který se u klidových buněk nachází výhradně ve vnitřní vrstvě fosfolipidové dvojvrstvy plazmatické membrány. U apoptotických a v některých případech i aktivovaných buněk (Smrž et al., 2007) je PS externalizován na vnější vrstvě fosfolipidové dvojvrstvy plazmatické membrány, kde se účastní celé řady procesů a interakcí s celou řadou molekul a receptorů (DeKruyff et al., 2010). V případě Tim-3 se PS váže do jeho FG-CC' smyčky IgV domény. K této vazbě dochází i u Tim-1 a Tim-4 (DeKruyff et al., 2010). Tato interakce usnadňuje odstraňování

apoptotických tělísek a také podporuje zkříženou prezentaci antigenů dendritickými buňkami (Nakayama et al., 2009). T buňky sice nehrají roli při odstraňování apoptotických tělísek, interakce PS s Tim-3 však může mít za následek indukci IL-10 T buňkami. Bylo totiž prokázáno, že IL-10 je koexprimován T buňkami, které exprimují Tim-3 (Das et al., 2017).

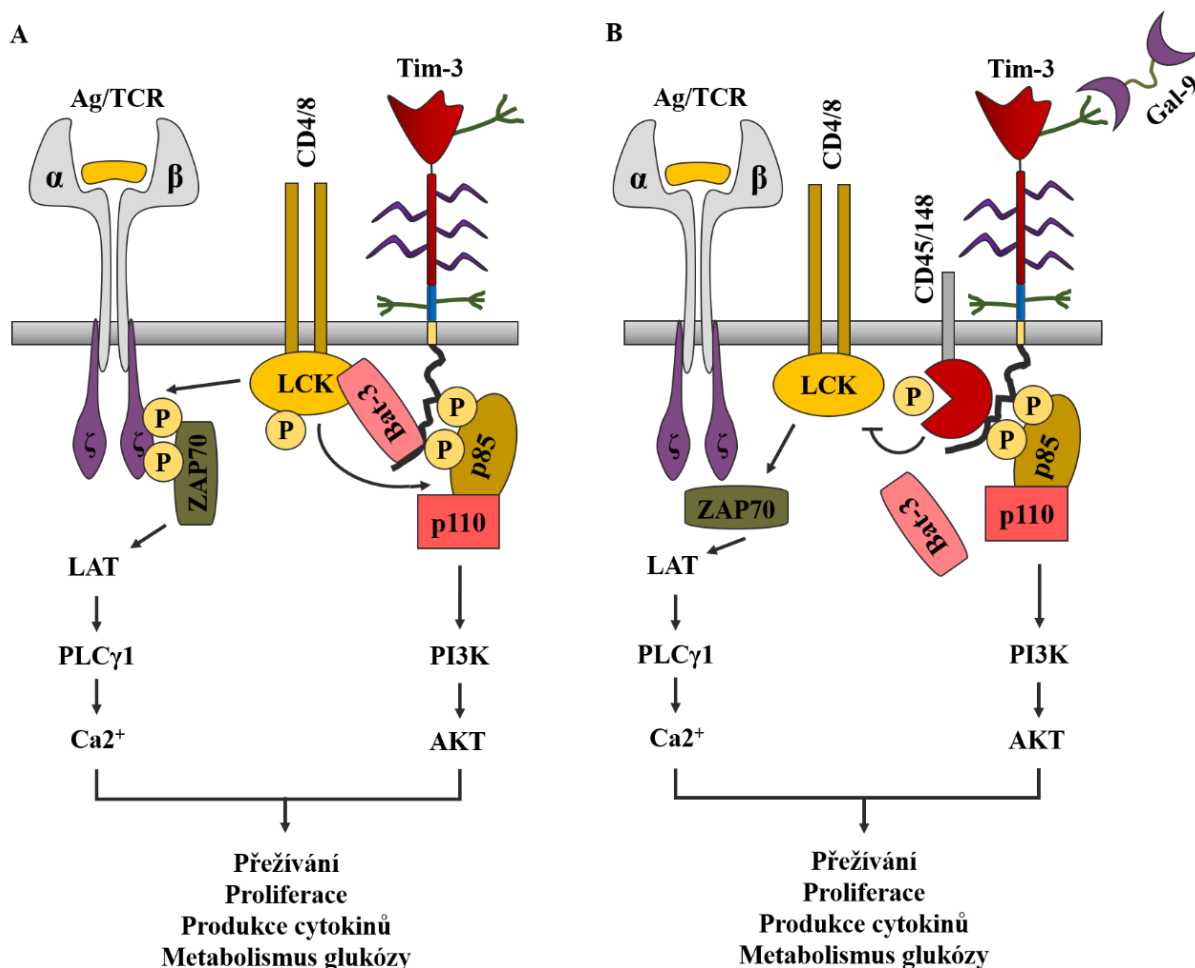
Přestože existuje několik studií zaměřených na porozumění signálním drahám Tim-3, mnoho aspektů interakce Tim-3 s jeho intracelulárními partnery, které zprostředkovávají inhibiční funkci, zůstává stále neprozkoumaných. Některé z nich naznačují inhibiční, jiné naopak stimulační účinky Tim-3.

2.5.1.2 Tim-3 signalizace

Cytoplazmatická část Tim-3 neobsahuje klasický ITIM (z angl. immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif) nebo ITSM (z angl. immunoreceptor tyrosine-based switch motif) motiv (Lee et al., 2011; van de Weyer et al., 2006), tedy známé struktury pro vazbu inhibičních fosfatáz, které by se podílely na inhibici buněčné signalizace zprostředkované receptory. Cytoplazmatické části myšího i lidského Tim-3 obsahují pět konzervovaných tyrozinových zbytků. Bylo zjištěno, že fosforylace dvou z těchto tyrozinových zbytků (Y 256, 263 u myši a 265, 272 u člověka) je kritická pro následnou downstream signalizaci (Das et al., 2017; van de Weyer et al., 2006). Peptidové sekvence obklopující tyto dva tyrozinové zbytky jsou vysoce konzervované mezi člověkem a myší a mohou být fosforylovány Src tyrozin kinázami, jako jsou Lck a Fyn. Fosforylované tyroziny pak mohou fungovat jako vazebné místo pro SH2 (z angl. Src-homology 2) doménu jiných signálních molekul (Das et al., 2017). Motiv vázající SH2 doménu je také trans-regulačním místem pro řízení Tim-3 signální transdukce (Rangachari et al., 2012).

Exprese Tim-3 v absenci jeho ligandu zvyšuje TCR signalizaci (Lee et al., 2011). Bylo však také prokázáno, že Tim-3 může inhibovat proximální signalizaci TCR (Clayton et al., 2014; Tomkowicz et al., 2015). U Tim-3⁺CD8⁺ efektorových T buněk indukuje Gal-9 kolokalizaci Tim-3 s receptorovými fosfatázami CD45 a CD148 skrze takzvané „lipidové rafty“ (lipid rafts), a tím pak inhibuje TCR signalizaci (Clayton et al., 2014). Ukázalo se, že Bat-3 se váže na cytoplazmatickou část Tim-3 a Gal-9 spuštěná fosforylace tyrozinů vede k jeho uvolnění z Tim-3 (Clayton et al., 2014). Bat-3 je schopen zvrátit inhibiční efekt Tim-3 na TCR signalizaci, a to pravděpodobně rekrutováním aktivní Lck nebo blokováním vazby Fyn na Tim-3 (Anderson et al., 2016; Clayton et al., 2014). Z jiné studie vyplývá, že Tim-3 je

stabilně exprimován na buňkách Jurkat, kde inhibuje TCR zprostředkovanou aktivaci NF- κ B / NFAT (Rangachari et al., 2012). Z těchto studií vyplývá, že efekt Tim-3 na TCR signalizaci závisí na stavu buňky a na ligandu, který se na něj váže.



Obrázek 4: Schéma Tim-3 signalizace. (A) Pokud je TCR stimulován v nepřítomnosti Tim-3 ligandu, je Bat-3 spojen s cytoplazmatickým koncem Tim-3 a aktivní Lck, která fosforyluje jak obě CD3 ζ podjednotky TCR komplexu, tak i Y256 a Y263 Tim-3. Následně je rekrutována ZAP70 do TCR komplexu a p85, regulační podjednotka PI3K, k cytoplazmatickému konci Tim-3. Tím dojde k aktivaci dráhy ZAP70/LAT/PLC γ 1/Ca $^{2+}$ a dráhy PI3K/AKT, které podporují přežívání a proliferaci T buněk. (B) Vazba Gal-9 na Tim-3 vede k vytěsnění Bat-3 z Tim-3. Následně jsou rekrutovány fosfatázy CD45 a CD148, což vede k defosforylaci Lck, downregulaci TCR signální dráhy ZAP70/LAT/PLC γ 1/Ca $^{2+}$ a potlačení přežívání a proliferace T buněk (Yang and Hung, 2017).

2.5.1.3 Role Tim-3 v imunopatologických stavech a regulaci T buněčné odpovědi

Význam Tim-3 v regulaci T buněčné odpovědi je potvrzen skutečností, že exprese Tim-3 a jeho negativní regulační funkce jsou dysregulovány u pacientů s roztroušenou sklerózou (Koguchi et al., 2006) a že je tento stav zvrátitelný léčbou pomocí glatiramer acetátu nebo IFN- β (Yang et al., 2008). *In vitro* aktivované Th1 buňky střevní sliznice a periferní krve pacientů s Crohnovou chorobou vykazovaly nižší expresi Tim-3 ve srovnání s buňkami zdravých jedinců (Morimoto et al., 2011). Naopak zvýšená exprese byla pozorována u pacientů s revmatoidní artritidou, kdy exprese Tim-3 na CD4⁺ a CD8⁺ T buňkách negativně korelovala se závažností onemocnění (Liu et al., 2010). To naznačuje, že hladina exprese Tim-3 na T buňkách negativně koreluje s progresí autoimunitních onemocnění.

Nadměrná exprese Tim-3 buňkami vrozeného imunitního systému byla pozorována také u některých druhů nádorů, jako jsou například nemalobuněčný karcinom plic, lymfom či karcinom prostaty (Xu et al., 2017). Afanasiev a kol. pozorovali výrazně zvýšenou expresi Tim-3 u TIL (Afanasiev et al., 2013). Příkladem je také exprese Tim-3 na leukemických kmenových buňkách (LSC, z angl. leukemic stem cells) u pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML, z angl. acute myeloid leukemia), zatímco na normálních hematopoetických buňkách kostní dřeně nebyla tato exprese pozorována (Jan et al., 2011). Bylo také zjištěno, že hladiny ligandu Tim-3, Gal-9, jsou zvýšeny u pacientů s akutní myeloidní leukémií. Kikushige a kol. ukázali, že Tim-3 a Gal-9 tvoří autokrinní smyčku kritickou pro samoobnovení LSC a rozvoj lidské AML a že cílení na tuto autokrinní smyčku by mohlo být užitečnou strategií pro léčbu myeloidních leukémií (Kikushige et al., 2015). Jinde bylo u AML zjištěno, že Tim-3 aktivuje PI3K-Akt-mTOR a HIF-1 signální dráhy, čímž upreguluje glykolýzu a angiogenezi (Prokhorov et al., 2015).

2.5.1.4. Role Tim-3 ve vyčerpání T buněk a protinádorové imunitě

Zvýšená exprese Tim-3 koreluje se supresí T buněčné odpovědi a dysfunkcí T buněk, také označovanou jako „exhaustion“ neboli „vyčerpání“ T buněk. Jedná se o proces postupné ztráty jejich efektorové funkce, jako jsou cytotoxicita a produkce cytokinů v důsledku virových infekcí a nádorů (Wherry and Kurachi, 2015). Cytotoxické lymfocyty ztrácejí nejprve schopnost produkce IL-2, později TNF- α a nakonec IFN- γ (Wherry and Kurachi, 2015). Role Tim-3 ve vyčerpání T buněk byla poprvé popsána u pacientů s infekcí virem HIV-1 (Jones et al., 2008) a Tim-3 tak byl vyhodnocen jako imunitní kontrolní bod, který

kontroluje T buněčnou imunitu proti řadě chronických virových infekcí, jako jsou infekce způsobené virem hepatitidy B (Wu et al., 2011), hepatitidy C (Golden-Mason et al., 2009) a Friend virus (Takamura et al., 2010).

Obdobně jako u virových infekcí Tim-3 slouží jako imunitní regulátor u nádorových onemocnění. Vysoká exprese Tim-3 je spojována s horší prognózou nádorové progresy prokázanou například u karcinomu prostaty související s vyčerpáním T buněk specifických na prostatický specifický antigen (Japp et al., 2015). Kromě efektorových T buněk byla exprese Tim-3 prokázána také u FoxP3⁺ Treg, u kterých zvyšuje jejich regulační funkci (Sakuishi et al., 2013). Exprese Tim-3 byla objevena také na DC infiltrujících nádor, které hrají roli při potlačování vrozené protinádorové odpovědi. Tim-3 se dá tedy považovat za negativní regulační molekulu spojenou jak s vyčerpáním T buněk, tak s potlačením vrozených imunitních mechanismů (Chiba et al., 2012).

Kromě regulace vrozených imunitních mechanismů u nádorových onemocnění, Tim-3 rovněž reguluje adaptivní protinádorovou imunitu. Ukázalo se, že blokování dráhy Tim-3 zvyšuje protinádorovou odpověď a produkci IFN- γ u T buněk (Cai et al., 2016). V *in vitro* a *in vivo* modelech korelovala exprese Tim-3⁺CD8⁺ T buněk s expresí PD-1. PD-1 a Tim-3 pozitivní T buňky produkují méně IFN- γ než Tim-3 negativní CD8⁺ T buňky (Takano et al., 2016). Další studie ukázaly, že blokace dráhy Gal-9 stimulované Tim-3 signální dráhy udržuje aktivitu a proliferaci T buněk, což vede k trvalé protinádorové odpovědi (Sims et al., 2010).

2.5.1.5 Tim-3 u expandovaných antigen specifických CD8⁺ T buněk

Mnohé studie ukazují, že exprese Tim-3 je spojena s negativní regulací protinádorové odpovědi. V případě *in vitro* připravovaných nádorově specifických T buněk však není role exprimovaného Tim-3 doposud objasněna. Předchozí studie totiž ukázaly, že extenzivní expanze TIL je spojena s nárůstem Tim-3⁺ T buněk, avšak s poklesem PD-1⁺ T buněk. Zároveň se ukázalo, že Tim-3⁺ T buňky expandovaných TIL byly schopny sekrece IFN- γ a lýzy nádorových buněk *in vitro* (Owens et al., 2018). Tato zjištění naznačují, že role Tim-3 v regulaci *in vitro* expandovaných nádorově specifických CD8⁺ T buněk je patrně odlišná od role, kterou tato molekula nabývá u těchto buněk v nádorovém mikroprostředí.

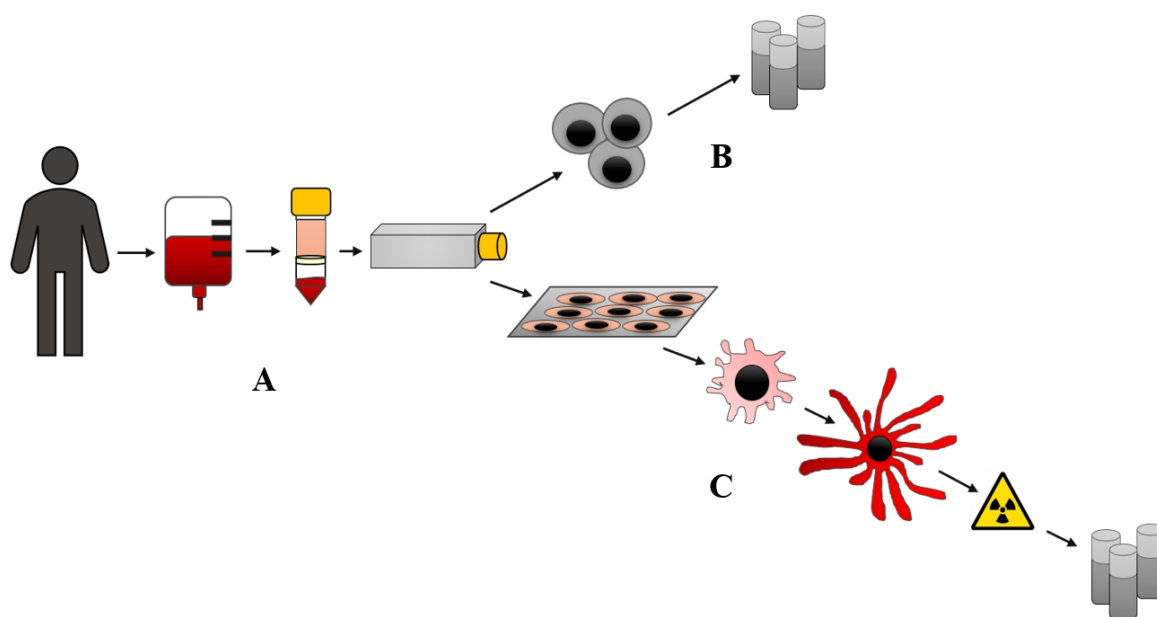
3 CÍLE PRÁCE

1. Připravit *in vitro* maturované dendritické buňky z monocytů izolovaných z buffy coatů zdravých dárců.
2. Připravit *in vitro* expandované antigen specifické T buňky pomocí kombinované stimulace izolovaných lymfocytů směsí *in vitro* připravených alogenních dendritických buněk, inaktivovaných nádorových buněk prostatické linie PC-3 a cytokinu IL-2.
3. U expandovaných buněk určit zastoupení T buněk rozeznávajících nádorové buňky prostatické linie PC-3.
4. U expandovaných buněk stanovit expresi Tim-3 a vliv této exprese na stimulaci PC-3 specifických T buněk.

4 METODY

4.1 *In vitro* příprava a charakterizace maturovaných DC

Zdrojovým biologickým materiálem pro přípravu maturovaných DC byly buffy coaty získané od zdravých dárců krve (Obr. 5). Z tohoto materiálu byly následně izolovány mononukleární buňky periferní krve (PBMC). Neadherentní frakce PBMC (lymfocyty) byla zamrzena. Adherentní frakce PBMC (monocyty) byla diferencována na nezralé DC. Tyto DC byly následně maturovány a po inaktivaci γ -zářením zamrazeny.

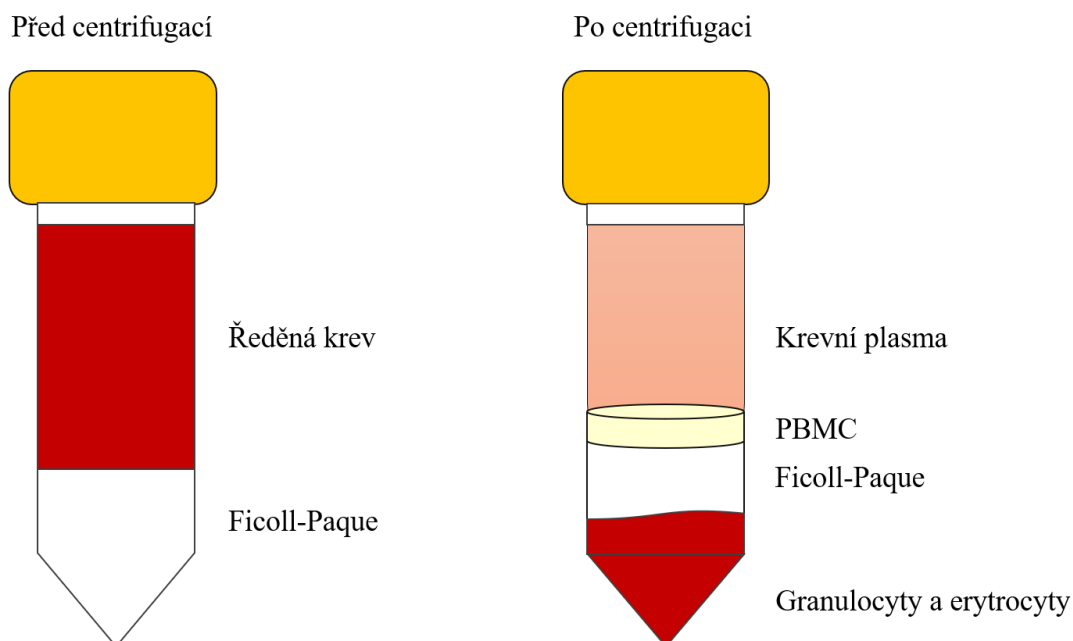


Obrázek 5: Schéma přípravy lymfocytů a DC z buffy coatů zdravých dárců. (A) Z buffy coatů zdravých dárců jsou pomocí hustotní gradientové centrifugace izolovány PBMC. PBMC jsou frakcionovány v kultivační lahvi na adherentní a neadherentní frakci. (B) Neadherentní frakce lymfocytů je dále zpracována a zamrzena. (C) Adherentní frakce (monocyty) jsou diferencovány na nezralé DC. Nezralé DC jsou maturovány, inaktivovány γ zářením a zamrazeny pro další zpracování.

4.1.1 Izolace PBMC z buffy coatů zdravých dárců pomocí hustotní gradientové centrifugace

Buffy coaty byly získány od zdravých dárců krve, kteří podstoupili odběr na Ústavu hematologie a krevní transfuze (ÚHKT) v Praze. Buffy coaty byly získány s písemným informovaným souhlasem dárců.

Buffy coat zdravých dárců byl naředěn fosfátovým pufrem (PBS) s 2 mM kyselinou ethylendiamintetraoctovou (EDTA) v objemovém poměru 1 : 1. Směs o objemu 25–35 ml byla navrstvena na 15 ml Ficollu-Paque PLUS (17-1440-03; GE Healthcare, Uppsala, Sweden) v 50 ml zkumavce (TPP, Trasadingen, Switzerland). Zkumavky byly centrifugovány při 1800 rpm (520 g) po dobu 30 minut při pokojové teplotě (RT) v režimu pomalého zrychlení a bez brzdění po skončení centrifugace, aby nedošlo k porušení rozvrstvených buněk v hustotním gradientu (Obr. 6). Prstenec PBMC vzniklý po centrifugaci na rozhraní Ficollu-Paque a séra byl odebrán a přenesen do nové 50 ml zkumavky. Odebrané PBMC byly jednou promyty 50 ml studeného PBS/EDTA a následně dvakrát studeným PBS. Centrifugace probíhala při 1200 rpm (240 g) po dobu 10 minut při 4 °C. Supernatant byl slit a vzniklá peleta PBMC byla resuspendována v 1 ml kompletního média (KM) [médium RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) obsahující 10% fetální bovinní sérum (FBS; HyClone, GE Healthcare Life Sciences, South Logan, UT) a 100 U/ml penicilin-streptomycin; sterilizace 0,22 µm filtrací (Nalgene, Rochester, NY)]. Poté byly buňky kultivačním médiem doplněny na 10 ml a spočítány pomocí počítačky buněk (Z2™ COULTER® Counter, Beckman Coulter, Brea, CA).



Obrázek 6: Schéma rozvrstvení frakcí po hustotní gradientové centrifugaci. Buňky se centrifugací rozdělí na základě své hustoty. Prstenec mononukleárních buněk se vytvoří na rozhraní Ficoll-Paque a krevní plazmy.

4.1.2 Frakcionace PBMC na lymfocyty a monocyty

Koncentrace PBMC suspenze byla pomocí KM upravena tak, aby výsledná povrchová hustota buněk v adherentní kultivační lahvi (TPP, Trasadingen, Switzerland) nebyla vyšší než 1×10^6 buněk/cm² kultivační plochy. Po přenosu suspenze do adherentní kultivační lahve byly buňky inkubovány ve 37 °C a 5% CO₂ po dobu 2 hodin. Během inkubace monocyty adherovaly na dno kultivační lahve, zatímco lymfocyty nikoliv. Neadherentní frakce lymfocytů byla odebrána do 50 ml zkumavky a dále zpracována (kapitola 4.1.3). Adherované monocyty byly diferencovány na DC (kapitola 4.1.4).

4.1.3 Zpracování lymfocytů z PBMC

Frakcionované lymfocyty odebrané v adherentní frakci (kapitola 4.1.2) byly promíchány a spočítány (Z2™ COULTER®). Po centrifugaci 1200 rpm (240 g)/10 min/4 °C byl supernatant odstraněn a peleta resuspendována v 1 ml zamrazovacího média [směs v objemovém poměru 70 % KM, 20 % FBS, 10 % dimethyl sulfoxid (DMSO; Sigma-Aldrich,

St. Louis, MO); sterilizace 0,22 μ m filtrací (Nalgene)] a zamrazovacím médiem byl objem upraven na koncentraci buněk $4\text{--}60 \times 10^6/\text{ml}$. Takto upravená suspenze byla po 0,5 ml rozdělena do zamrazovacích zkumavek (Nalgene) a uložena přes noc do -80°C v zamrazovacím boxu CoolCell™ (Corning, Corning, NY). Další den byly zamražené zkumavky přeneseny do tekutého dusíku a uchovány pro další zpracování.

4.1.4 Diferenciace monocytů na nezralé DC

Frakcionované monocyty adherované v kultivační lahvi (kapitola 4.1.2) byly dvakrát opláchnuty PBS, aby došlo k odmytí zbytkových neadherentních buněk. Adherované monocyty byly následně kultivovány v KM médiu s 1000 IU/ml GM-CSF a 1000 IU/ml IL-4 (ImmunoTools, Friesoythe, Germany) ve 37°C a 5% CO_2 po dobu 4 dní. Přidáním těchto cytokinů byla zahájena diferenciace na nezralé DC. V den 4 byly do buněčné kultury přidány GM-CSF (1000 IU/ml) a IL-4 (1000 IU/ml) a buňky byly kultivovány 1 den.

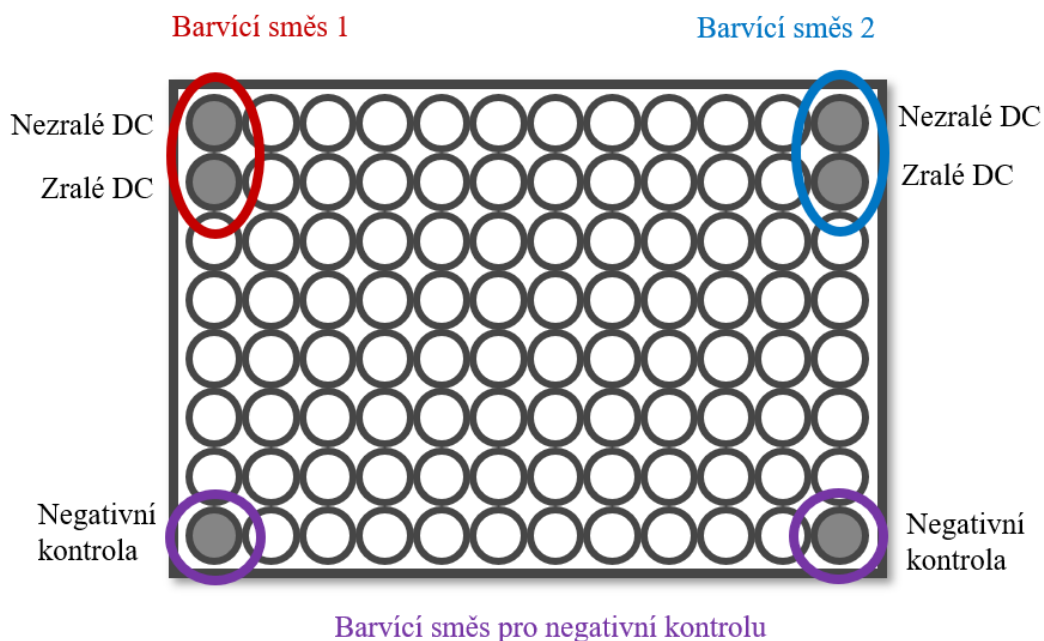
4.1.5 Maturace DC

Po 5 denní diferenciaci kultura obsahovala již neadherentní buňky. Buněčná kultura byla převedena z kultivační lahve do 50 ml zkumavky. Po centrifugaci (1200 rpm (240 g)/10 min/RT) byla peleta jemně resuspendována v 1 ml KM s 2000 IU/ml GM-CSF a 2000 IU/ml IL-4. Buňky byly spočítány (Z2™ COULTER®) a koncentrace buněčné suspenze byla upravena na $2 \times 10^6/\text{ml}$ pomocí KM s 2000 IU/ml GM-CSF a 2000 IU/ml IL-4. Část buněk ($4 \times 100 \mu\text{l}$) byla odebrána pro pozdější analýzu (kapitola 4.1.6). K suspenzi bylo přidáno KM o stejném objemu s maturačními činidly R848 (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) v koncentraci 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a poly I:C (Hycult Biotech, Uden, Holandsko). Finální koncentrace maturačních činidel byla 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ R848 a 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ poly I:C. Buňky pak byly inkubovány do druhého (16–24 h) dne ve 37°C a 5% CO_2 . Po ukončení maturace byly buňky spočítány (Z2™ COULTER®), z kultivační lahve přeneseny do 50 ml zkumavky a část buněčné suspenze ($2 \times 200 \mu\text{l}$) byla odebrána pro pozdější analýzu (kapitola 4.1.6). Zbytek buněk byl schlazen na ledu po dobu 10–20 min a následně ozářen γ zářením dávkou 32 Gy přístrojem Gammacell 3000 ELAN (Best Theratronics, Ottawa, Ontario, Kanada). Po ozáření byly buňky centrifugovány (1200 rpm (240 g)/10 min/RT), supernatant odstraněn a peleta resuspendována v 1 ml zamrazovacího média [70% KM, 10% DMSO (Sigma-Aldrich), 20 %

FBS], kterým byl také upraven objem tak, aby byly buňky zamrazeny v počtu $0,7 \times 10^6$ /zamrazovací zkumavku. Zamrazovací zkumavky byly umístěny přes noc do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ v zamrazovacím boxu CoolCell™ (Corning) a následující den uchovány v tekutém dusíku.

4.1.6 Charakterizace maturovaných DC

Následující postup byl prováděn na ledu. Do 96 jamkové V destičky (Thermo Fisher Scientific) byla přenesena DC suspenze (odpovídá 200 tis. DC na jamku). Vzorky s odlišnými barvicími směsmi bylo nutno od sebe dostatečně oddělit, aby nedošlo ke vzájemné kontaminaci těchto barvicích směsí (Obr. 7). Jako negativní kontrola (buňky barvené pouze CD11c specifickou protilátkou) byly použity nezralé nebo maturované DC.



Obrázek 7: Příklad rozložení vzorků a jejich barvení v 96 V destičce. Mezi vzorky s odlišnými barvicími směsmi byla ponechána dostatečná vzdálenost, čímž bylo minimalizováno riziko vzájemné kontaminace těchto směsí.

Po nanesení vzorků byla destička centrifugována při 1300 rpm (315 g) po dobu 5 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Supernatant byl z destičky vyklepnut, jamky byly promyty 200 μl studeného PBS/EDTA a destička byla opět centrifugována při 1300 rpm (315 g)/5 min/ $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po vyklepnutí supernatantu bylo do jamek přidáno 50 μl barvicí směsi protilátek (Tabulka 1)

k extracelulárnímu barvení DC. Buňky byly resuspendovány a inkubovány po dobu 30–60 minut při 4 °C v lednici v temnu.

Barvicí směsi protilátek v PBS/EDTA:

Barvicí směs 1: CD83-FITC, CD86-PE, CD11c-APC

Barvicí směs 2: CD80-FITC, CD11c-APC, HLA-DR-PECy7

Barvicí směs pro negativní kontrolu: CD11c-APC

Tabulka 1: Barvicí směsi a protilátky použité pro měření fenotypu DC pomocí průtokové cytometrie.

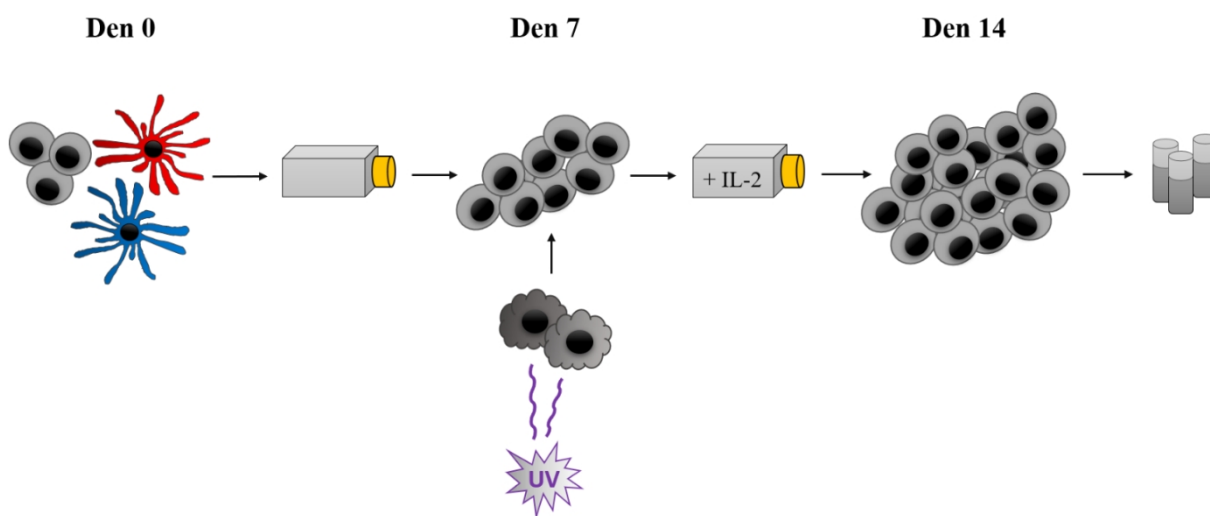
Specifita	Značení	Ředění	Katalogové číslo	Výrobce
CD83	FITC	20 ×	PN IM 2410U	Beckman
CD86	PE	20 ×	PN IM 2729U	Beckman
CD11c	APC	20 ×	1A-529-T100	Beckman
CD80	FITC	20 ×	PN IM 1853U	Beckman
HLA-DR	PECy7	100 ×	335830	BD Biosciences

Po ukončení inkubace byla destička centrifugována při 1300 rpm (315 g)/5 min/4 °C. Supernatant byl z destičky vyklepnut a jamky byly dvakrát promyty 200 µl studeného PBS/EDTA. Po druhém promytí bylo k jamkám přidáno 40 µl studeného PBS/EDTA. Těsně před měřením byly buňky v jamkách resuspendovány a přeneseny do 5 ml BD FACS zkumavky (BD Biosciences, San Jose, CA) s 200 µl studeného PBS/EDTA s 0,25 µg/ml DAPI (4',6-diamidin-2'-phenylindol dihydrochlorid) pro obarvení mrtvých buněk. Buňky byly analyzovány průtokovou cytometrií pomocí FACSAriaII (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Data získaná průtokovou cytometrií byla analyzována pomocí software FlowJo (TreeStar, Ashland, OR). Získaná data byla statisticky vyhodnocena v programu GraphPad Prism 6 software (GraphPad software, La Jolla, CA).

4.2 In vitro příprava expandovaných antigen specifických T buněk

Příprava antigen specifických T buněk sestávala ze dvou částí (Obr. 8). V první části byly izolované lymfocyty primovány alogenními DC dvou dárců, z nichž jeden byl HLA-A2⁺ a druhý HLA-A2⁻. Primované lymfocyty byly následně kultivovány po dobu 7 dní. V druhé

části byly lymfocyty kultivovány společně s inaktivovanými nádorovými buňkami v přítomnosti IL-2 po dobu 7 dní a následně zamrazeny.



Obrázek 8: Schéma přípravy expandovaných antigen specifických T buněk.

4.2.1 Priming lymfocytů alogenními DC

Lymfocyty izolované z buffy coatů zdravých dárců byly rozmrazeny ve 37 °C vodní lázni. Rozmražené lymfocyty byly opatrně přeneseny do 15 ml zkumavky (TPP) a k buňkám bylo pomalu přikapáno 10 ml lymfocytárního média (LM) [(médium RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific) obsahujícího 5% lidské sérum (One Lambda, Canoga Park, CA), 100 U/ml penicilin–streptomycin, 2 mM Glutamax, 1 mM sodium pyruvate a non-essential amino acid mix (Thermo Fisher Scientific)]. Buněčná suspenze byla opatrně promíchána opakovaným překlopením zkumavky a následně centrifugována při 1200 rpm (240 g)/10 min/RT. Supernatant byl opatrně slit a peleta buněk byla resuspendována v 1 ml LM. Celá buněčná suspenze byla přenesena do 6 jamkové destičky (Nalgene) s předem připravenými 3 ml LM. Lymfocyty byly kultivovány přes noc ve 37 °C a 5% CO₂.

Následující den byly ve 37 °C vodní lázni rozmrazeny γ zářením inaktivované alogenní DC dvou dárců, lišících se alelou HLA-A2. Rozmražené DC byly opatrně přeneseny do prázdné 15 ml zkumavky (TPP) (dárce byli zpracovávaní odděleně) a doplněny přikapáním 12 ml LM. Buňky byly jemně promíchány opakovaným překlopením zkumavky a centrifugovány při 1200 rpm (240 g)/10 min/RT. Supernatant byl opatrně slit a peleta byla

resuspendována ve 400 μ l LM. Buňky byly spočítány (Z2™ COULTER®) a pomocí LM upraveny na koncentraci $0,5 \times 10^6$ /ml. Suspenze buněk obou dárců o koncentraci $0,5 \times 10^6$ /ml byly spojeny v objemovém poměru 1 : 1 v 15 ml zkumavce a jemně promíchány. Suspenze lymfocytů kultivovaná z přechozího dne ve 37 °C a 5% CO₂ byla převedena do 15 ml zkumavky (TPP) a centrifugována při 1200 rpm (240 g)/10 min/RT. Supernatant byl slit a peleta resuspendována v 1 ml LM. Buňky byly spočítány (Z2™ COULTER®) a jejich koncentrace upravena LM na 1×10^6 /ml. Do 48 F jamkové destičky bylo přidáno 200 μ l suspenze směsi alogenních DC a 500 μ l suspenze lymfocytů, celkem tedy 700 μ l na jamku tak, aby byl zachován poměr 1 (DC) : 5 (lymfocyty). Buňky byly extenzivně promíchány resuspendací a inkubovány ve 37 °C a 5% CO₂ po dobu 7 dní.

4.2.2 Repriming T buněk UV inaktivovanou nádorovou linií PC-3

PC-3 linie (Kaighn et al., 1979) byla 2 dny před reprimingem pasážována ($0,1 \times 10^6$ buněk) do 48 jamkové destičky (Thermo Fisher Scientific) v 1 ml KM a inkubována ve 37 °C a 5% CO₂. Jako kontrola bylo použito samotné KM bez PC-3 buněk. V den reprimingu (den 7) byly 48 jamkové destičky s PC-3 či kontrolní destička zchlazeny po dobu 10 minut ve 4 °C. Poté byly PC-3 poprvé ozářeny UV zářením (312 nm, 2,55 J/cm²) pomocí Bio-Link® crosslinker BLX E312 (Vilber Lourmat, Collégien, Francie) po dobu 10 minut při RT. Destičky byly znovu zchlazeny a poté opět ozářeny. Po následném zchlazení byly buňky připraveny pro repriming.

V den 7 byla buněčná suspenze primovaných T lymfocytů ve 48 jamkové destičce resuspendována a přenesena do 50 ml zkumavky (TPP). Buňky byly spočítány (Z2™ COULTER®) a jejich koncentrace byla upravena pomocí LM na 2×10^6 /ml. Před samotným reprimingem byl z jamek zchlazené 48 jamkové destičky odsát všechn supernatant a pomalu přikapáno 750 μ l suspenze lymfocytů o koncentraci $2,0 \times 10^6$ /ml. Buňky byly posléze inkubovány ve 37 °C a 5% CO₂. V den 8 bylo ke kultuře přidáno 500 μ l LM s 160 IU/ml IL-2. V den 9 byly buňky v suspenzi v jamkách extenzivně resuspendovány a suspenze přenesena do větších jamek. K suspenzi byl přidán objemový ekvivalent LM s 80 IU/ml IL-2. V den 11 byl k buňkám přidán 50% objemový ekvivalent LM s 160 IU/ml IL-2. V den 12 byl k buňkám přidán objemový ekvivalent LM s 160 IU/ml IL-2. V den 14 byly buňky zamrazeny jako DC v sekci 4.1.5, ale s tím rozdílem, že bylo použito jiné zamrazovací médium [80 %

LM, 10 % DMSO (Sigma-Aldrich), 10% lidské sérum (One Lambda)] a buňky byly zamrazeny v koncentraci $10\text{--}60 \times 10^6/\text{ml}$.

4.3 Detekce antigen specifických CD8⁺ T buněk po stimulaci živými PC-3 buňkami

Z lahve s PC-3 konfluentní kulturou byl v den stimulace odstraněn supernatant, buňky byly dvakrát promyty PBS a poté inkubovány ve 3 ml roztoku Trypsin/EDTA (Thermo Fisher Scientific) ve 37 °C a 5% CO₂ po dobu 12–15 minut. Trypsinizované PC-3 buňky byly po přidání 10 ml LM přeneseny do 15 ml zkumavky a centrifugovány při 1200 rpm (240 g)/10 min/RT. Supernatant byl slit a peleta byla resuspendována v 1 ml LM. Buňky byly spočítány (Z2™ COULTER®) a jejich koncentrace byla upravena na $1 \times 10^6/\text{ml}$.

Dva dny před stimulací byly expandované antigen specifické T buňky rozmrazeny ve 37 °C vodní lázni. Rozmražené buňky byly opatrně přeneseny do prázdné 15 ml zkumavky (TPP) a doplněny přikapáním 12 ml LM. Buňky byly jemně promíchány opakovaným překlopením zkumavky a centrifugovány při 1200 rpm (240 g)/10 min/RT. Supernatant byl opatrně slit a peleta byla resuspendována v 1 ml LM s 80 IU/ml IL-2. Koncentrace buněk byla upravena pomocí LM s 80 IU/ml IL-2 na $2\text{--}5 \times 10^6/\text{ml}$ a buňky inkubovány do dalšího dne (16–24 h). Druhý den byl u části buněk odstraněn IL-2 pomocí centrifugace [1200 rpm (240 g)/10 min/RT] a propláchnutí buněčné suspenze LM. Buňky byly kultivovány do dalšího dne (18–24 h).

V den stimulace byly rozmražené buňky přeneseny do 15 ml zkumavky a centrifugovány při 1200 rpm (240 g)/10 min/RT. Supernatant byl opatrně slit a peleta byla resuspendována v 1 ml LM nebo LM s 80 IU/ml IL-2. Buňky byly spočítány (Z2™ COULTER®) a pomocí LM byla jejich koncentrace upravena na $4,0 \times 10^6/\text{ml}$. Suspenze buněk o objemu 50 µl byla přenesena do 96 U jamkové destičky (Thermo Fisher Scientific). Vybrané jamky byly stimulovány samotnými, předem připravenými PC-3 buňkami, samotným 4 µg/ml Gal-9 (R&D, Minnesota, USA) a PC-3 buňkami současně s Gal-9. Jako kontrola byl použit samotný PBS. Pro každý typ vzorku byly takto připraveny čtyři jamky celkem s 50 µl buněčné suspenze a 50 µl příslušného stimulantu. Destička s buňkami byla inkubována ve 37 °C a 5% CO₂. Po jedné hodině inkubace bylo do jamek opatrně přidáno 20 µl LM s dvěstěkrát ředěným roztokem brefeldinu A [Brefeldin A Solution (1,000X), Biolegend, San Diego, Kalifornie]. Buňky byly dále inkubovány v 37 °C a 5% CO₂ po dobu dalších čtyř hodin.

Po pěti hodinách stimulace bylo z jamek opatrně odstraněno 70 μ l supernatantu a příslušné vzorky byly spojeny vždy do jedné jamky. Do těchto jamek bylo přidáno 50 μ l 25 mM vodného roztoku EDTA a destička byla ponechána 5–10 min/RT. Poté byl obsah jamek resuspendován a přenesen do 96 jamkové V destičky. Destička byla centrifugována při 1300 rpm (315 g)/5 min/4 °C. Supernatant byl z destičky vyklepnut a jamky byly dvakrát promyty 200 μ l studeného PBS/EDTA. Buňky byly následně barveny LIVE/DEAD™ Fixable Aqua Dead Cell Stain Kit (Thermo Fisher Scientific) pro označení mrtvých buněk; finální ředění zásobního roztoku barvicí směsi bylo pětisetnásobné. Destička byla centrifugována při 1300 rpm (315 g)/5 min/4 °C. Supernatant byl z destičky vyklepnut a jamky byly jedenkrát promyty 200 μ l studeného PBS/EDTA. Buňky byly následně fixovány při 4 °C po dobu 30–45 min užitím 200 μ l fixačního roztoku; 1 díl eBioscience™ Fixation/Permeabilization Concentrate a 4 díly eBioscience™ Fixation Permeabilization Diluent (v obou případech Thermo Fisher Scientific). Po skončení fixace byla destička centrifugována při 1900 rpm (620 g)/5 min/4 °C. Supernatant byl z destičky vyklepnut a do jamek bylo přidáno 200 μ l permeabilizačního roztoku; desetkrát ředěný roztok eBioscience™ Permeabilization Buffer (10X) (Thermo Fisher Scientific) v deionizované vodě s následným stonásobným naředěním normálního myšního séra (Thermo Fisher Scientific). Buňky byly permeabilizovány přes noc při 4 °C v lednici v temnu. Po skončení fixace byla destička centrifugována při 1900 rpm (620 g)/5 min/4 °C. Supernatant byl z destičky vyklepnut a do jamek přidáno 100 μ l barvicí směsi v permeabilizačním roztoku (Tabulka 2). Buňky byly resuspendovány a inkubovány po dobu 45–60 minut při 4 °C v lednici v temnu. Po skončení barvení byla destička centrifugována při 1900 rpm (620 g)/5 min/4 °C. Supernatant byl z destičky vyklepnut, do jamek bylo přidáno 40 μ l studeného PBS/EDTA a vzorky byly (bez přidání DAPI) analyzovány průtokovou cytometrií. Data byla zpracována jako v sekci 4.1.6.

Tabulka 2: Barvicí směsi a protilátky použité pro měření antigen specifických CD8⁺ T buněk.

Specifita	Značení	Ředění	Katalogové číslo	Výrobce
CD4	PeCy7	100 ×	25-0049-42	eBioscience
CD3	PerCP-Cy5.5	50 ×	45-0036-42	eBioscience
CD8	A700	50 ×	A7-207-T100	Exbio
IFN- γ	PE	20 ×	559327	BD Biosciences
TNF- α	APC	100 ×	562084	BD Biosciences

4.4 Statistická analýza

Statistická významnost byla počítána z vybraného počtu vzorků (n) použitím počítačového programu GraphPad Prism (GraphPad software, La Jolla, Kalifornie, USA). Při párovém srovnání byl použit Studentův t-test, při srovnání více jak dvou vzorků byla použita jednofaktorová analýza rozptylu (angl. one-way ANOVA).

5 VÝSLEDKY

5.1 *In vitro* příprava a charakterizace DC

Jako zdroj buněk pro *in vitro* přípravu DC byl použit buffy coat. Během studie bylo zpracováno šest buffy coatů od šesti zdravých dárců (Tabulka 3).

Tabulka 3: Vyhodnocení izolace PBMC a přípravy maturovaných DC.

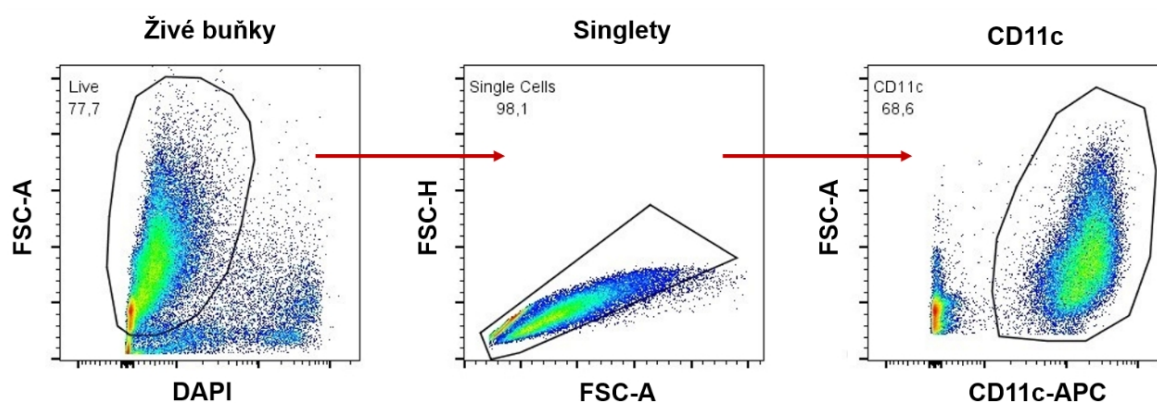
Dárc e	Pohlaví	HLA-A2	Objem buffy coatu (ml)	PBMC ($\times 10^6$)	Lymfocytů ($\times 10^6$)	Nezralých DC ($\times 10^6$)	Maturovaných DC ($\times 10^6$)
1	M	+	50	611	546	17,7	17,6
2	M	+	46	702	621	46,6	43,7
3	M	-	60	934	715	20,6	14,7
4	Ž	-	41	317	N/D	6,5	N/D
5	M	-	44	573	477	15,6	10,9
6	Ž	N/D*	45	558	529	5,9	N/D

* *nedostupný*

Z šesti dárců byli dvě ženy a čtyři muži. Dva dárce (muži) byli HLA-A2⁺ a tři dárce (dva muži a jedna žena) byli HLA-A2⁻. U jednoho dárce (žena) nebyl daný genotyp dostupný (N/D). Objem jednotlivých buffy coatů byl přibližně 50 ml. Průměrné množství izolovaných lymfocytů na 500×10^6 PBMC bylo 432×10^6 [$n = 5$, SD (směrodatná odchylka) 34×10^6]. Průměrné množství získaných nezralých DC na 500×10^6 PBMC bylo $14,3 \times 10^6$ ($n = 6$, SD $8,8 \times 10^6$). Průměrné množství získaných maturovaných DC na 500×10^6 PBMC bylo $15,7 \times 10^6$ ($n = 4$, SD $10,6 \times 10^6$).

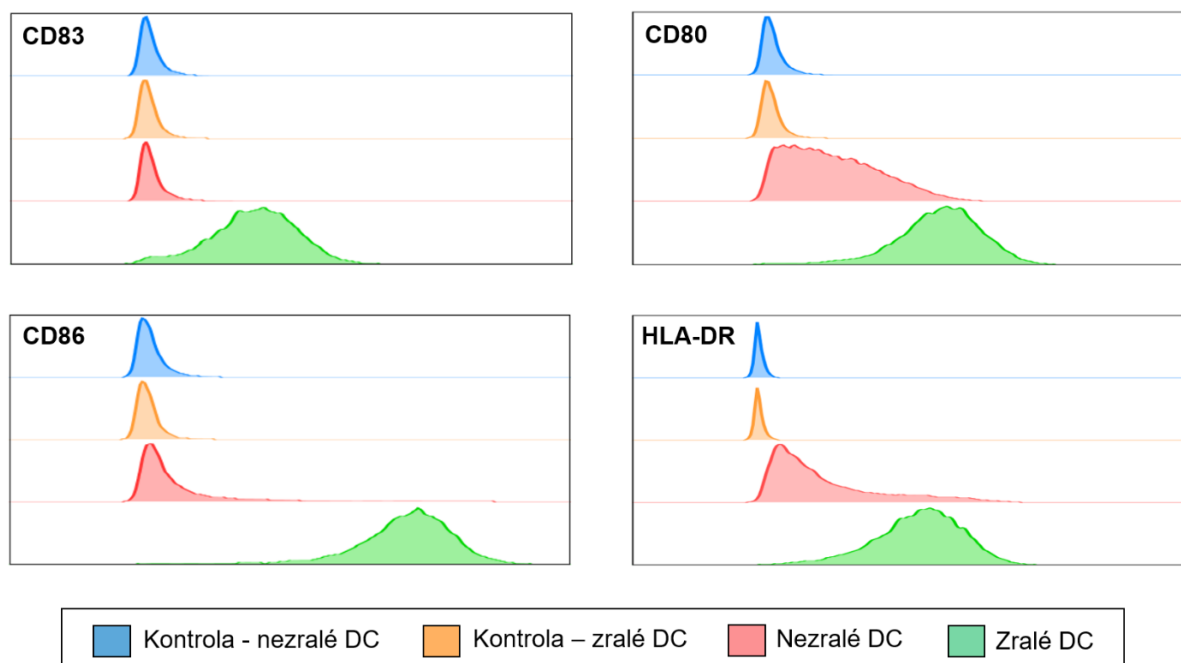
Izolované PBMC byly frakcionovány adherencí na lymfocyty (neadheretní frakce) a monocyty (adherentní frakce) (sekce 4.1.2). Lymfocyty byly zamrazeny (sekce 4.1.3) a monocyty diferencovány na nezralé DC (sekce 4.1.4). Nezralé DC byly následně maturovány (sekce 4.1.5).

Získané nezralé a maturované DC byly hodnoceny na životnost a procentuální zastoupení DC v buněčné směsi. Životnost získaných buněk byla stanovena průtokovou cytometrií jako procento DAPI negativních (DAPI⁻) buněk (Obr. 9, levý panel). U živých buněk bylo následně metodou FCS-H/FSC-A analýzy provedeno odfiltrování buněčných agregátů (Obr. 9, prostřední panel). Po tomto odfiltrování bylo stanoveno procentuální zastoupení DC na základě povrchové exprese markerů CD11c (Obr. 9, pravý panel).



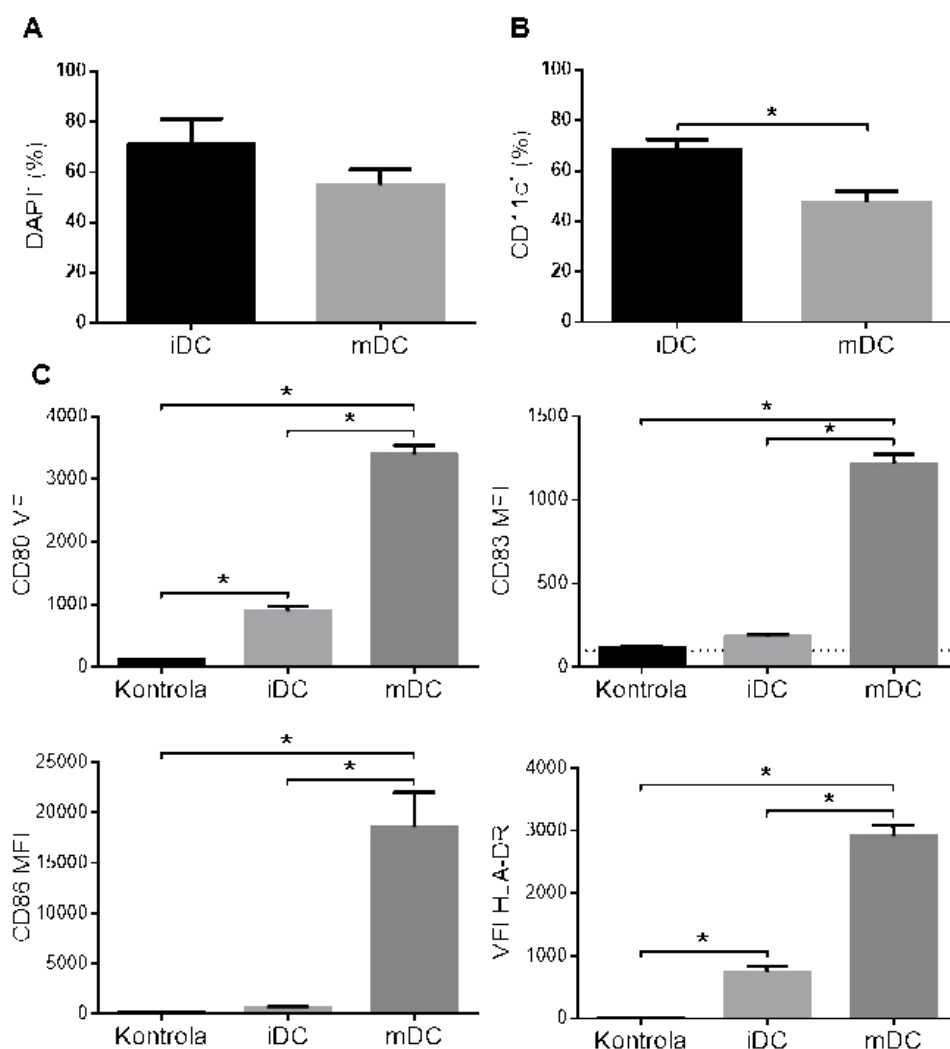
Obrázek 9: Strategie analýzy dat z průtokové cytometrie.

Míra maturace indukované u nezralých DC směsí maturačních činidel R848 (TLR7/8 agonista) a poly I:C (TLR3 agonista) byla hodnocena cytometrickým stanovením povrchové exprese maturačních markerů CD80, CD83, CD86 a HLA-DR u živých (DAPI⁺) nezralých a maturovaných DC (CD11c⁺) (Obr. 10). Jako negativní kontrola byly použity buňky značené pouze CD11c specifickou protilátkou.



Obrázek 10: Histogramy znázorňující intenzitu fluorescence proti značeným maturačním markerům CD83, CD80, CD86, HLA-DR na živých DC (DAPI⁺CD11c⁺). Jako (negativní) kontrola jsou znázorněny buňky značené pouze CD11c specifickou protilátkou.

Cytometrická analýza zralých a maturovaných DC byla provedena u 5 dárců (Tabulka 3). Výsledky ukázaly, že průměrná životnost byla 71,0 % ($n = 5$, SD 10,1 %) u nezralých DC a 54,7 % ($n = 5$, SD 14,2 %) u maturovaných DC. Přestože průměrná životnost byla nižší u maturovaných DC, nebyla signifikantně nižší oproti životnosti nezralých DC (Obr. 11 A). Procentuální zastoupení DC ($CD11c^+$) v analyzované buněčné směsi bylo u nezralých DC 68,4 % ($n = 5$, SD 4,1 %) a u maturovaných DC 47,7 % ($n = 5$, SD 9,6 %). Procentuální zastoupení DC po jejich maturaci bylo však již signifikantně nižší oproti nematurovaným (nezralým) DC (Obr. 11 B). Významným prvkem maturace DC jsou změny v povrchové expresi maturačních markerů. Tato exprese byla u všech sledovaných markerů signifikantně zvýšena po maturaci DC (Obr. 11 C).



Obrázek 11: Analýza nezralých (iDC) a maturovaných (mDC) DC. (A) Životnost. (B) Zastoupení DC ($CD11c^+$ buněčné populace). (C) Expresie maturačních markerů (MFI, intenzita fluorescence značení markerů, $n = 5$, SD, * $p < 0,05$).

Získaná data ukázala, že pomocí uvedeného postupu bylo možné reproducidbilně získat dostatečné množství maturovaných DC, které mohly být následně užity pro *in vitro* přípravu antigen specifických T buněk.

5.2 *In vitro* příprava antigen specifických T buněk

Pro přípravu antigen specifických T buněk byly využity γ inaktivované *in vitro* připravené DC, UV inaktivované nádorové buňky prostatické linie PC-3 a cytokin IL-2. Příprava sestávala ze dvou fází (viz sekce 4.2).

V první fázi byly lymfocyty dárce stimulovány (primovány) směsí alogenních DC dvou dárců, přičemž jeden byl HLA-A2⁻ a druhý HLA-A2⁺ (Tabulka 4).

Tabulka 4: Znásobení počtu buněk kultivací v den 7 a den 14.

				Znásobení počtu buněk kultivací	
Dárce lymfocytů	HLA-A2 dárce lymfocytů	Dárce HLA-A2 ⁻ alogenních DC	Dárce HLA-A2 ⁺ alogenních DC	Den 7	Den 14
2	+	5	1	8,626	229,164
3	-	5	1	9,386	290,294
4	-	3	2	4,493	38,65

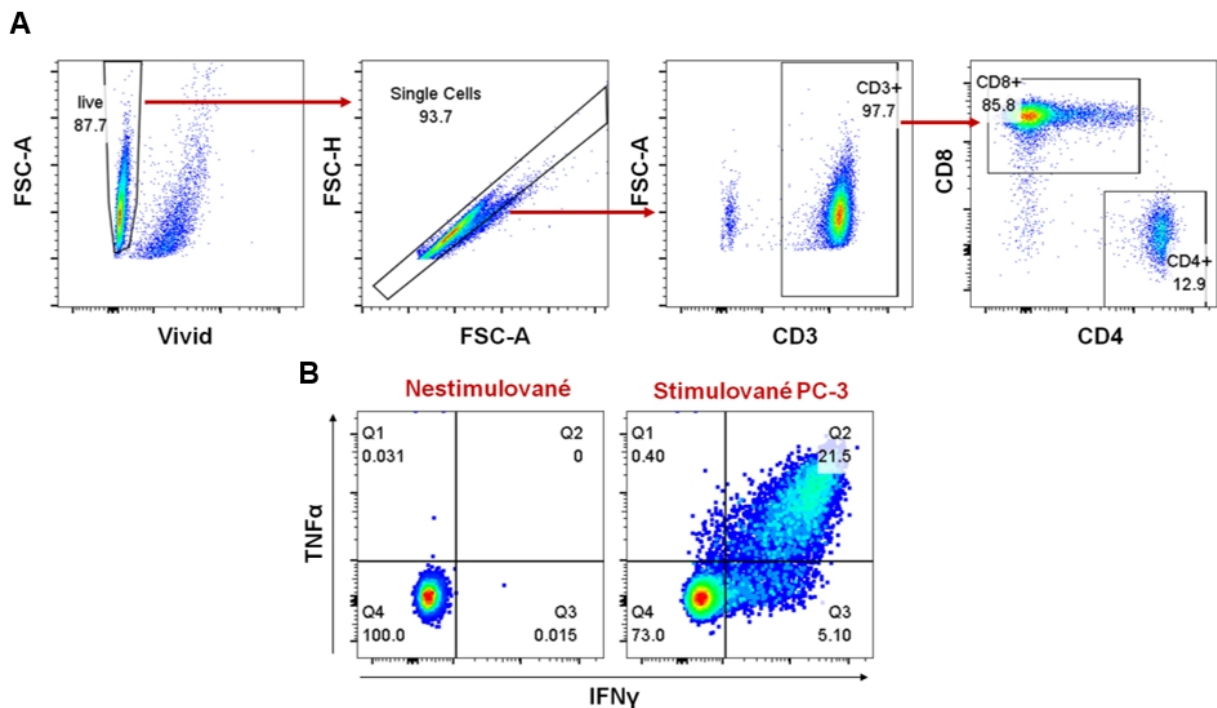
HLA-A2 inkompatibilita alogenních DC byla zvolena za účelem vyvolání a zajištění silné aloreaktivní odpovědi bez ohledu na inkompatibilitu mezi samotnými lymfocyty a alogenními DC. Silnou aloreaktivitou bylo předpokládáno nasměrování lymfocytů do Th1 typu odpovědi a senzitivace těchto lymfocytů vůči antigenům nádorových buněk. Během této fáze došlo k expanzi primovaných buněk. Za sedm dní se počet lymfocytů v průměru znásobil 7,5 krát ($n = 3$, SD 2,6).

V druhé fázi, po sedmi dnech kultivace, byly lymfocyty stimulovány kultivovanými nádorovými buňkami prostatické linie PC-3, která byla těsně před stimulací inaktivována UV zářením. Den po stimulaci (den 8) byl do kultury zároveň přidán cytokin IL-2 a buňky byly dále kultivovány v jeho přítomnosti po dobu dalších 6 dní. Tyto kultivační podmínky zajistily, že došlo k preferenční expanzi lymfocytů, které rozeznaly antigeny prostatických nádorových

buněk PC-3. Po 14 dnech kultivace byl celkový počet buněk v průměru znásobený 186 krát ($n=3$, SD 131,2). Expandované buňky byly zamrazeny a uchovány pro další analýzu.

5.3 Antigenní specificita *in vitro* připravených T buněk vůči nádorovým buňkám PC-3

Expandované *in vitro* připravené T buňky byly testovány na přítomnost populací, které rozeznají antigeny nádorových buněk PC-3. Zamrazené *in vitro* připravené antigen specifické T buňky od tří zdravých dárců (kapitola 4.2) byly přes noc (18–24 h) rekonstituovány v LM v přítomnosti IL-2. Přítomnost IL-2 při rekonstituci byla nutná pro dostatečnou životnost rekonstituovaných buněk (pozorování z předešlých experimentů). Následující den byly buňky stimulovány kokultivací s živými PC-3 nádorovými buňkami. Aktivace T buněk byla detekována vnitrobuněčným barvením T buněk na prozánětlivé cytokiny IFN- γ a TNF- α . Analýza stimulovaných buněk prokázala přítomnost T buněčné populace, která byla stimulována PC-3 nádorovými buňkami (Obr. 12). Tato data ukázala, že navržený systém přípravy PC-3 specifických T buněk představuje vhodný model pro studium *in vitro* expandovaných antigen specifických T buněk.

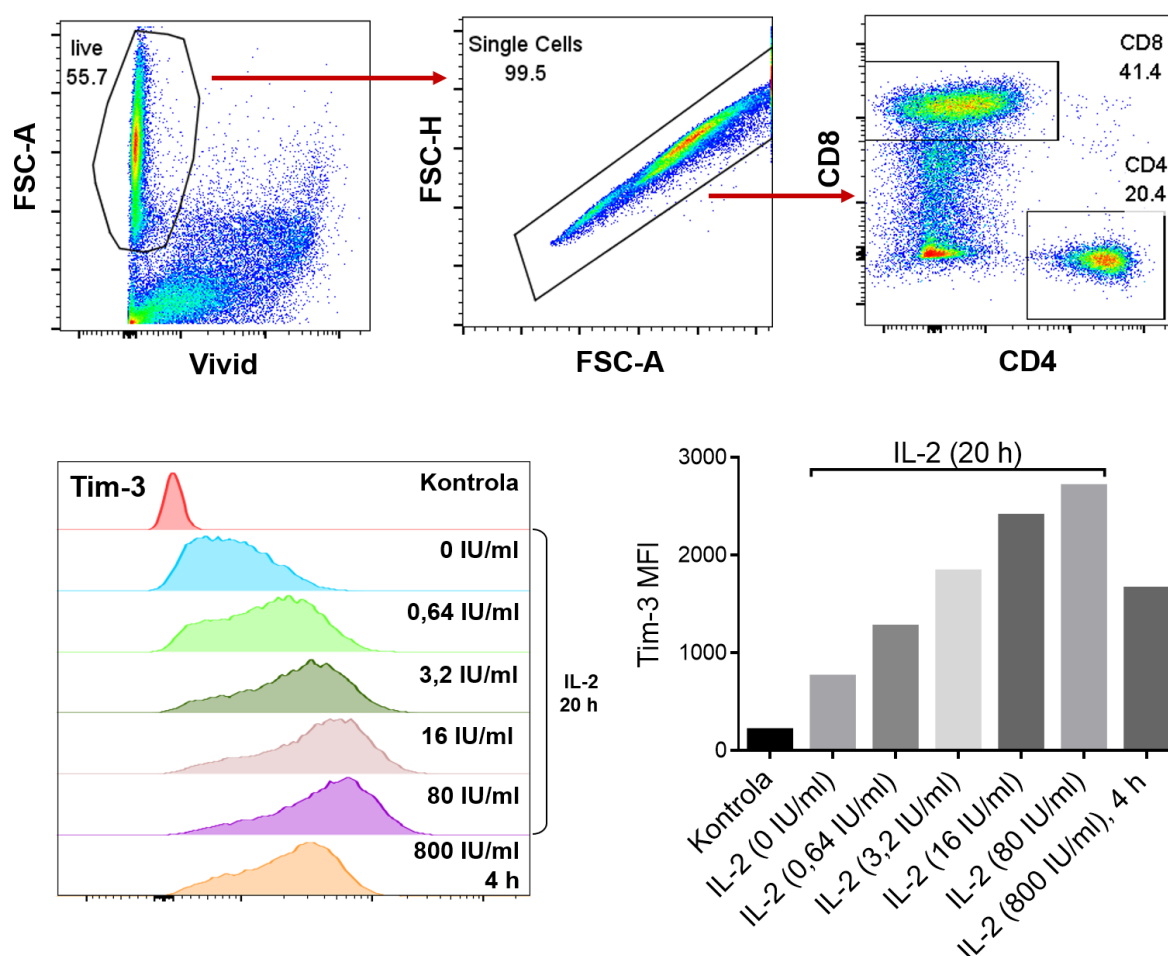


Obrázek 12: Reaktivita expandovaných CD8⁺ T buněk vůči živým PC-3. (A) Strategie analýzy dat z průtokové cytometrie. (B) Expres proinflamatorních cytokinů u expandovaných CD8⁺ T buněk po stimulaci živými PC-3 buňkami. Ukázán je reprezentativní experiment.

5.4 Expres Tim-3 u *in vitro* připravených T buněk

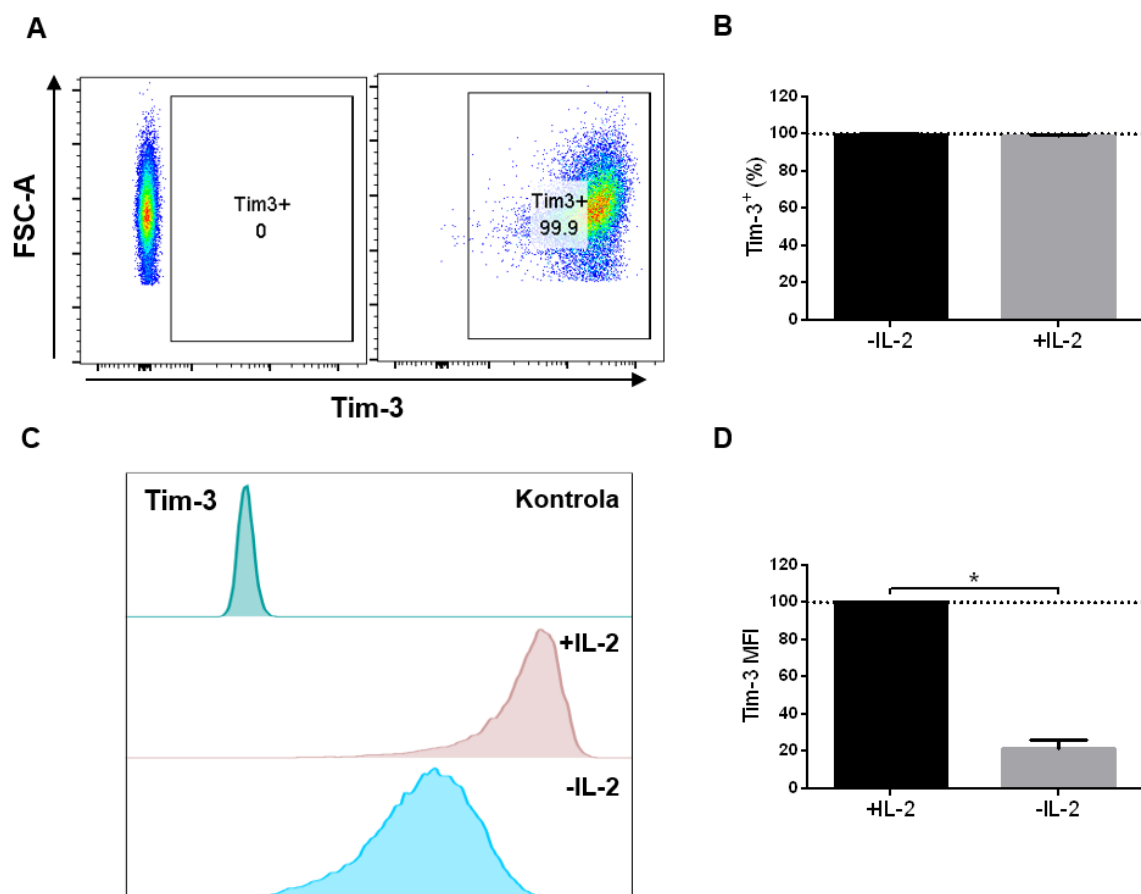
Dřívější studie ukázala, že při expanzi TIL dochází ke zvýšení exprese Tim-3 u expandovaných T lymfocytů (Owens et al., 2018). Jiná studie zároveň ukázala, že exprese Tim-3 je indukována cytokiny, jako jsou IL-2, IL-7, IL-15 a IL-21 (Mujib et al., 2012). Výsledky této druhé studie byly zde potvrzeny v pilotním experimentu, kdy ještě u nezamrazených *in vitro* připravených antigen specifických T buněk (v sekci 4.2) byl přes noc (18 h) odebrán cytokin IL-2 a druhý den opět přidán v různých koncentracích po dobu dvaceti hodin. Zároveň čtyři hodiny před skončením kultivace byl k jednomu vzorku buněk bez IL-2 přidán IL-2 o vysoké koncentraci (800 IU/ml) za účelem zjištění rychlosti *de novo* povrchové exprese po krátkém (4 h) působení cytokinu. Výsledky tohoto pilotního experimentu ukázaly, že u *in vitro* připravených T buněk dochází k IL-2 indukované expresi Tim-3, a to již ve velmi nízkých koncentracích (<1 IU/ml) (Obr. 13 B–C). Míra této exprese byla závislá na přidávané koncentraci IL-2 a byla pozorována již po čtyřech hodinách působení IL-2 (Obr. 13 B–C). Výsledky tohoto experimentu zároveň nastolily otázku, zdali tato exprese

může být svým charakterem reverzibilní. K zodpovězení této otázky jsme již použili zamražené buňky.



Obrázek 13: Vliv IL-2 na povrchovou expresi Tim-3 na $CD8^+$ buňkách. (A) Strategie analýzy dat z průtokové cytometrie. (B) Histogramy znázorňující intenzitu povrchového značení molekuly Tim-3 na $CD8^+$ buňkách. (C) Graf intenzit povrchového značení Tim-3 na $CD8^+$ buňkách.

Zamražené *in vitro* připravené antigen specifické T buňky tří zdravých dárců byly přes noc (18–24 h) rekonstituovány v LM v přítomnosti IL-2. Druhý den byl u části buněk odstraněn cytokin IL-2 a buňky byly kultivovány do dalšího dne (18–24 h). Následně bylo u těchto buněk provedeno stanovení povrchové exprese Tim-3 (Obr. 14).



Obrázek 14: Reverze povrchové exprese Tim-3 u $CD8^+$ T buněk po odebrání IL-2. (A) Strategie analýzy dat z průtokové cytometrie byla provedena způsobem jako na obrázku 15 níže, kdy byla analyzována Tim-3⁺ populace u $CD8^+$ T buněk. (B) Statistická analýza Tim-3⁺ $CD8^+$ T buněk u buněčných kultur kultivovaných s IL-2 (80 IU/ml) (+IL-2) a u buněčných kultur kultivovaných v nepřítomnosti IL-2 po dobu 18-24 h (-IL-2) ($n = 3$, SD, $*p < 0,05$). (C) Intenzita povrchové exprese Tim-3 u $CD8^+$ T buněk u buněčných kultur kultivovaných s IL-2 a v nepřítomnosti IL-2. Negativní kontrolu představovaly buněčné kultury neznačené Tim-3 specifickou protilátkou. (D) Intenzity exprese u (C) byly normalizovány a statisticky vyhodnoceny ($n = 3$, SD, $*p < 0,05$).

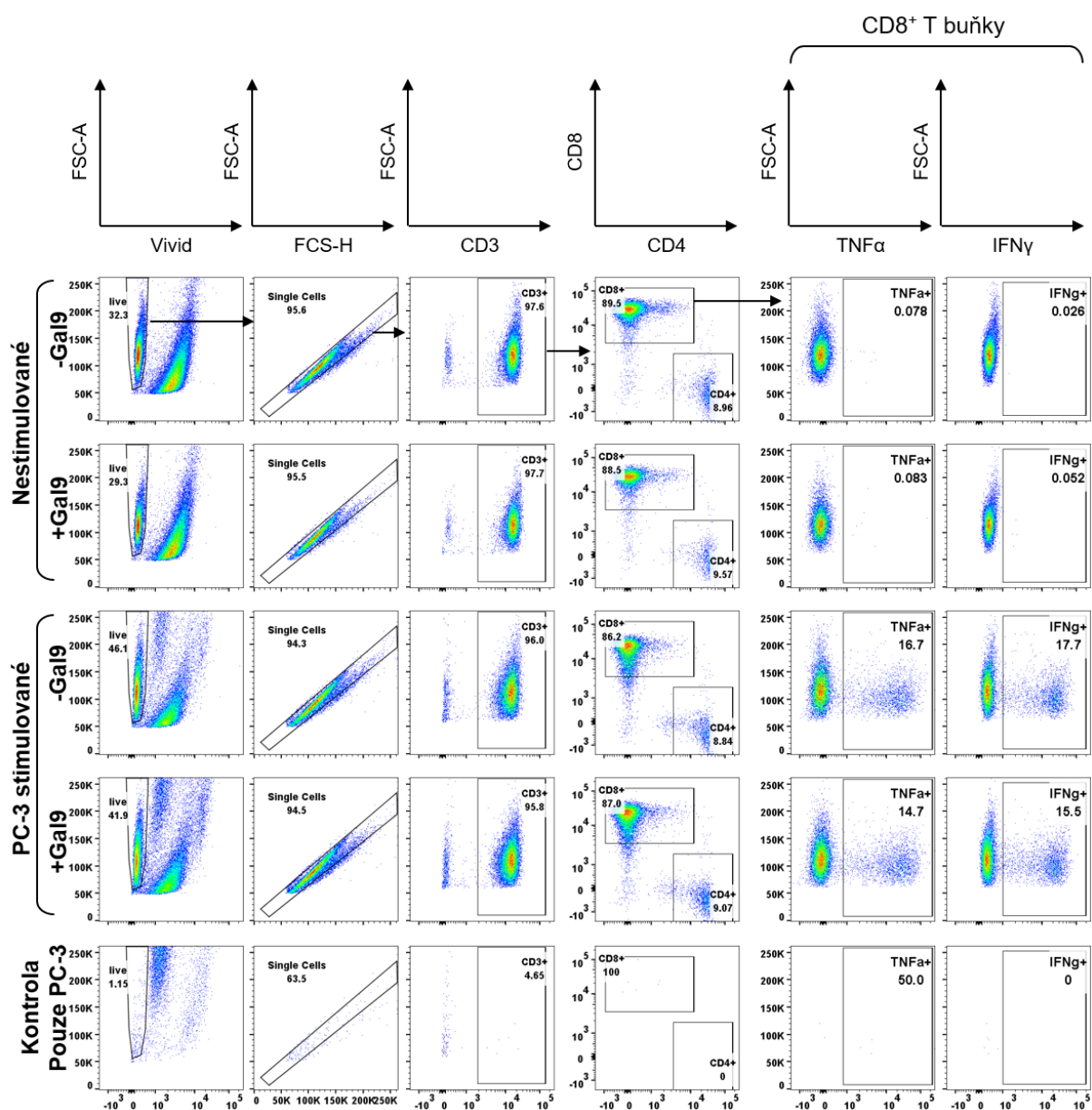
Jak je patrné, bez ohledu na odstranění IL-2 z buněčné kultury, značná část T buněk expimovala Tim-3 na svém povrchu (Obr. 14 A–B). Nicméně při analýze intenzity exprese se zjistilo, že u buněk, kde byl odstraněn cytokin IL-2, byla míra exprese signifikantně nižší (Obr. 14 C–D). Tato data ukázala, že značná část *in vitro* expandovaných T buněk expimuje v přítomnosti IL-2 Tim-3 na svém povrchu. Nicméně po odstranění cytokinu IL-2 tato

exprese významně klesla, což je známkou toho, že povrchová exprese Tim-3 u T buněk je podmíněna cytokinem IL-2 a je reverzibilní.

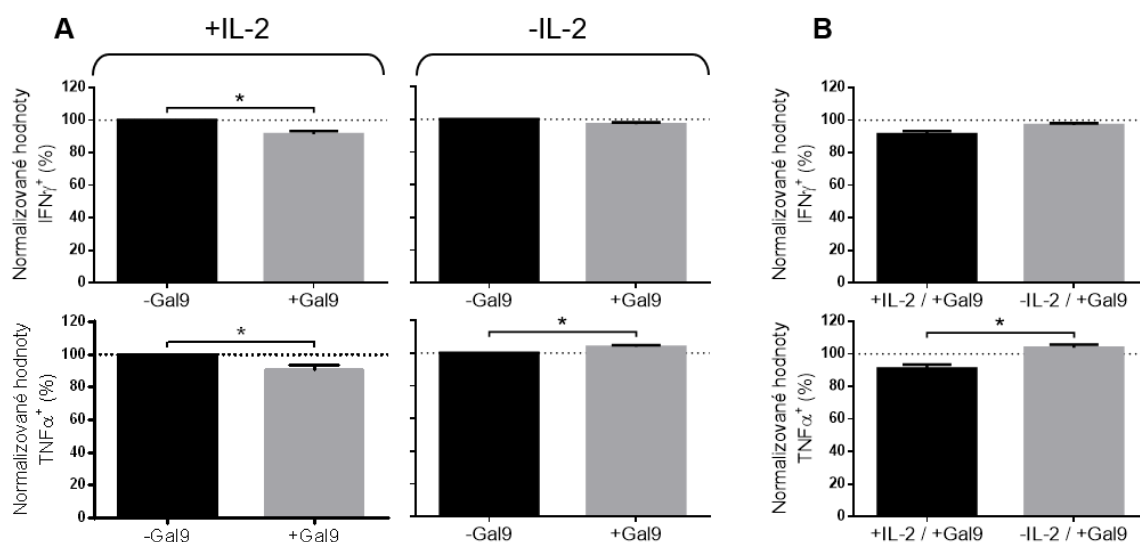
5.5 Funkční role Tim-3 u *in vitro* připravených antigen specifických T buněk

Předešlé experimenty ukázaly na IL-2 podmíněnou a reverzibilní expresi Tim-3 u expandovaných T buněk. Z daných výsledku však nebylo jasné, jestli zmíněná exprese ovlivní antigenem zprostředkovanou aktivaci *in vitro* připravených CD8⁺ T buněk. V dalším experimentu bylo proto testováno, jestli přítomnost Tim-3 ligandu, Gal-9, může ovlivnit aktivaci připravených CD8⁺ T buněk po jejich stimulaci nádorovými buňkami PC-3. Za tímto účelem byla provedena stimulace připravených T buněk živými nádorovými PC-3 buňkami, a to v přítomnosti či nepřítomnosti Gal-9. Stimulované buňky byly následně analyzovány průtokovou cytometrií (Obr. 15) a data byla statisticky vyhodnocena (Obr. 16).

Z analýzy vyplynulo, že v přítomnosti Gal-9 je velikost populace reagující na stimulaci živými PC-3 (produkce IFN- γ a TNF- α) signifikantně menší u CD8⁺ T buněk kultivovaných a aktivovaných v přítomnosti IL-2 (Obr. 16 A). Tato snížená reaktivita byla v menší míře a pouze částečně signifikantně (u TNF- α , ne však u IFN- γ) prokázána, pokud CD8⁺ T buňky byly kultivovány a stimulovány v nepřítomnosti IL-2 (Obr. 16 A). Tato snížená schopnost Gal-9 v nepřítomnosti IL-2 inhibovat antigenní stimulaci T buněk byla v případě detekce dané stimulace pomocí produkce TNF- α dokonce signifikantní (Obr. 16 B). Získaná data ukazují, že v přítomnosti IL-2, kdy je vyšší exprese Tim-3 u CD8⁺ T buněk, je účinnost inhibice jejich aktivace pomocí Gal-9 vyšší.



Obrázek 15: Strategie analýzy dat z průtokové cytometrie.



Obrázek 16: Vliv Gal-9 na stimulaci antigenně specifických CD8⁺ T buněk PC-3 buňkami. (A) T buňky kultivované v přítomnosti a nepřítomnosti IL-2 (80 IU/ml) byly stimulovány PC-3 buňkami v přítomnosti či nepřítomnosti Gal-9 (4 μ g/ml) a stimulované CD8⁺ T buňky byly detekovány na základě produkce intracelulárního IFN- γ a TNF- α . Populace stimulovaných CD8⁺ T buněk (IFN- γ^+ nebo TNF- α^+) byly normalizovány a statisticky vyhodnoceny ($n = 3$, SD, $*p < 0,05$). (B) Statistické vyhodnocení z (A) mezi populacemi s a bez IL-2 ($n = 3$, SD, $*p < 0,05$).

6 DISKUZE

V současné době je imunoterapie jednou z nejrychleji se rozvíjejících terapeutických modalit v léčbě nádorových onemocnění. Hlavním centrem zájmu v tomto rozvoji jsou inhibiční molekuly imunitních buněk, skrze které jsou nádorové buňky schopny unikat imunitnímu systému. Jednou z těchto molekul je i Tim-3, jehož role u nádorových onemocnění je, ve srovnání s ostatními inhibičními molekulami, jako jsou PD-1 a CTLA-4, stále nepříliš prozkoumána. V této diplomové práci byla sledována role Tim-3 u *in vitro* připravených antigen specifických CD8⁺ T buněk, které tvoří klíčovou komponentu léčebných přípravků pro adoptivní buněčnou imunoterapii nádorových onemocnění. Nedílnou součástí této práce byla i optimalizace metody, která umožňuje robustní a reprodučibilní *in vitro* přípravu dostatečného množství antigen specifických CD8⁺ T buněk s vysokou povrchovou expresí Tim-3, u kterých je možné funkci Tim-3 zkoumat. Výsledky práce ukázaly, že optimalizací protokolu pro *in vitro* přípravu antigen specifických CD8⁺ T buněk bylo dosaženo významné expanze dárcevských lymfocytů a jejich významného obohacení o antigen specifické CD8⁺ T buňky, což umožnilo zkoumání těchto buněk s vysokou citlivostí. Expandované a obohacené dárcevské lymfocyty zároveň exprimovaly na svém povrchu velké množství molekuly Tim-3, což rovněž umožnilo zkoumat tuto molekulu v kontextu *in vitro* kultivace a antigenní stimulace CD8⁺ T buněk. S využitím tohoto robustního studijního modelu bylo v této práci ukázáno, že významná exprese Tim-3 u expandovaných CD8⁺ T buněk je přímo podmíněna přítomností cytokinu IL-2 v kultuře a že míra této exprese je diktována jeho koncentrací. Dalším zjištěním této práce bylo, že zmíněná exprese Tim-3 je reverzibilní, jelikož po odebrání IL-2 z buněčné kultury došlo k významnému poklesu exprese této molekuly na povrchu CD8⁺ T buněk. Posledním poznatkem je prokázání alespoň částečné inhibiční funkce exprimovaného Tim-3 u CD8⁺ T buněk stimulovaných antigenem.

Vyvinutí metod přípravy antigen specifických buněk, které jsou schopny rozeznávat nádorové buňky, je jedním z cílů adoptivní buněčné imunoterapie nádorových onemocnění. Za tímto účelem jsou často užívány lymfocyty izolované přímo z nádorů, jelikož jsou již obohaceny o lymfocyty, které jsou schopny rozeznávat nádorové buňky (Rosenberg and Restifo, 2015). K expanzi těchto lymfocytů je obvykle využíván cytokin IL-2 o velmi vysoké koncentraci (>3000 IU/ml) (Hall et al., 2016). Studie ukázaly, že takto expandované buňky exprimují velké množství Tim-3 na svém povrchu. Aby bylo možné roli takto exprimovaného Tim-3 studovat, bylo nutné zavést experimentální model, který by umožnil přípravu buněk,

kteře by jednak exprimovaly velké množství Tim-3 na svém povrchu a jednak byly obohaceny o dostatečně velkou populaci antigen specifických T buněk, které by bylo možné skrze specifické antigeny stimulovat, a tím studovat vliv Tim-3 na tuto stimulaci.

K zavedení křžženého experimentálního modelu bylo využito netradičního postupu, kdy dárcovské lymfocyty byly, oproti jiným obvyklým postupům, nejprve primovány (stimulovány) alogenními DC, a až následně kultivovány v přítomnosti antigenů, které zajistí obohacení o antigen specifické T buňky. Původní protokol, který tento postup zaváděl, byl založen na užití jednoho HLA-A2 inkompatibilního dárce vůči dárci expandovaných lymfocytů. U tohoto postupu byly ale výsledky často nekonzistentní a lišící se dárce od dárce (data nebyla prezentována). Prvním úkolem byla optimalizace daného postupu za účelem zajištění konzistentního a robustního obohacení o antigen specifické CD8⁺ T buňky. Nový postup, který byl zaveden, spočíval ve využití dvou dárců alogenních DC. Tento postup sice již zajišťoval konzistentní výsledky v rámci různých dárců lymfocytů, obohacení o antigen specifické CD8⁺ T buňky bylo však malé a pohybovalo se pouze v jednotkách procent v rámci CD8⁺ T buněk (data nebyla prezentována). Další optimalizací jednotlivých kroků bylo nakonec dosaženo nejenom konzistentního, ale i dostatečně významného obohacení o antigen specifické CD8⁺ T buňky, které opakovaně dosahovalo hodnot přes deset procent v rámci populace CD8⁺ T buněk. Připravených buněk bylo zároveň opakovaně přes devadesát procent T buněk (CD3⁺ buňky) a tyto T buňky na svém povrchu exprimovaly velké množství Tim-3, což umožnilo jeho následné studium v druhé části této práce.

Zavedený experimentální model umožnil reprodučibilní *in vitro* přípravu antigen specifických CD8⁺ T buněk. Přestože tyto T buňky reagovaly s daným antigenem či směsí antigenů, jimiž byly právě antigeny PC-3 nádorových buněk užitě při jejich přípravě a zároveň stimulaci v následných analýzách, nebyla identita jednotlivých antigenů, vůči kterým obohacené CD8⁺ T buňky reagovaly, zkoumána. Lze však předpokládat, že velká část antigenů, které stimulovaly obohacené T buňky, byly aloantigeny. Při přípravě byla totiž užita směs alogenních DC v kombinaci s alogenními nádorovými buňkami. Na druhou stranu však nelze stále vyloučit, že jistá část antigenně specifických T buněk reagovala s nádorovými antigeny PC-3 buněk, jako jsou tumor asociované či tumor specifické antigeny (Durgeau et al., 2018). Při *in vitro* přípravě T buněk pro adoptivní buněčnou imunoterapii nádorových onemocnění bývají rovněž velmi často využívány alogenní buňky k zajištění expanze nebo naopak detekce nádorově specifických T buněk. Alogenní buňky ve formě takzvaných podpůrných buněk (z angl. feeder cells) jsou využívány k nespecifické expanzi TIL, a to buď ve formě γ -ozářených PBMC, nebo přímo *in vitro* připravených DC, obvykle ve směsi více

dárců (Forget et al., 2014; Gervais et al., 2009; Jin et al., 2014). Kromě podpůrných buněk jsou v protokolech rovněž využívány alogenní nádorové buňky, užívané například jako zdroje nádorových antigenů pro pulzaci DC (Filley and Dey, 2017) nebo přímo k detekci nádorově specifických CD8⁺ T buněk v expandovaných TIL (Carlsson et al., 2008). Na rozdíl od protokolů, které se snaží připravit *in vitro* nádorově specifické T buňky pro terapeutické účely, a kde aloreaktivita může významně snižovat podíl nádorově specifických CD8⁺ T buněk a tedy i terapeutickou účinnost výsledného produktu, podíl aloreaktivity u našeho studijního modelu nebyl podstatný, jelikož se svým mechanismem zásadně neodlišuje od mechanismu, kterým CD8⁺ T buňky rozeznávají nádorové antigeny, tedy skrze ligaci TCR a MHC I (Wang et al., 2017). Přestože se v této práci předpokládalo, že hlavním mechanismem stimulace připravených CD8⁺ T buněk je rozeznání MHC I na nádorových buňkách skrze TCR, kontrolní experimenty, které by tento mechanismus potvrzovaly, jako například inhibiční studie na bázi blokačních MHC I specifických protilátek (O'Neill, 1988), provedeny nebyly. Tyto experimenty jsou však plánovány a budou součástí připravované publikace.

Exprese Tim-3 je slibným kontrolním bodem (checkpoint) pro léčbu nádorových onemocnění. Mnohé studie ukazují, že jeho exprese na nádorových, případně imunitních buňkách v nádorech, je spojena s horší prognózou onemocnění (Li et al., 2012; Su et al., 2018). Jiné studie zase uvádějí opak (Wu et al., 2017). Na jedné straně je Tim-3 považován za marker vyčerpaných (exhausted) imunitních buněk (Mohammadizad et al., 2019), na druhé straně za marker buněčné aktivace (Mujib et al., 2012; So et al., 2019). Tato dichotomie Tim-3 pak často vede ke kontroverznímu chápání jeho funkce (Banerjee and Kane, 2018). Zde získané výsledky z expandovaných lymfocytů pomocí alogenních DC a nádorových buněk ukazují na Tim-3 jako na molekulu, jejíž povrchová exprese a míra této exprese přímo koreluje s množstvím cytokinu IL-2 v kultuře expandovaných lymfocytů. Tyto výsledky jsou v souladu s předchozími studiemi, které ukázaly, že povrchová exprese Tim-3 je indukována nejen cytokinem IL-2, ale také dalšími růstovými faktory lymfocytů, jako jsou IL-15, IL-7 nebo IL-21 (Mujib et al., 2012). Nečekaným výsledkem této práce je však zjištění, že tato exprese je značně reverzibilní a dynamická, jelikož při odstranění IL-2 z kultury dochází k výraznému poklesu exprese Tim-3 na povrchu CD8⁺ T buněk ve velmi krátké době (do 24 h). Přestože reverze byla zjištěna v této studii pouze u modelového *in vitro* systému, její možná existence *in vivo* by mohla do značné míry indikovat dynamičnost exprese Tim-3 u imunitních buněk v nádorovém mikroprostředí, a tím nepřímo indikovat aktuální cytokinové

prostředí, ve kterém se imunitní buňky zrovna nacházejí, spíše než pouze míru "vyčerpanosti" těchto buněk v tomto mikroprostředí (Banerjee and Kane, 2018).

Funkční význam povrchové exprese Tim-3 u T buněk je stále předmětem intenzivní debaty. Kromě původního významu, kdy označoval "vyčerpané" T buňky, zvláště v kombinaci s exprimovaným kontrolním bodem PD-1 (Banerjee and Kane, 2018), povrchová exprese Tim-3 u T buněk v nedávné době nabyla nového významu. Nedávná studie ukázala, že ektopická exprese Tim-3 u T buněk vede u myšího modelu k produkci krátce žijících efektorových T buněk a k poklesu vytváření prekurzorů paměťových buněk (Avery et al., 2018). Cytokin IL-2 je znám tím, že podněcuje diferenciaci T buněk do efektorových T buněk (Ross and Cantrell, 2018). Jak ukázaly dřívější práce, zároveň podněcuje expresi Tim-3 na povrchu T buněk (Mujib et al., 2012). V této studii se ukázalo, že míra exprese Tim-3 je zároveň úměrná koncentraci IL-2 přidávaného do kultivačního média. Na základě studie Avery a kol. (Avery et al., 2018), by se tedy dalo předpokládat, že antigenní stimulace při vysoké koncentraci IL-2 v kultivačním médiu povede spíše k nasměrování T buněk stimulovaných antigenem do efektorových buněk, zatímco při malé či nulové koncentraci IL-2 tato stimulace povede spíše k produkci paměťových buněk. Tento předpoklad však nelze zatím přímo aplikovat do kontextu této *in vitro* studie, jelikož studie Avery a kol. (Avery et al., 2018) byla prováděna *in vivo*.

Samotná signalizace spojená s molekulou Tim-3 je značně kontroverzní. Jedna studie ukázala, že geneticky indukovaná ektopická exprese Tim-3 v absenci jeho ligandu zvyšuje TCR signalizaci, zatímco v přítomnosti agonistické Tim-3 specifické protilátky bylo toto zvýšení potlačeno (Lee et al., 2011). Jiná studie naopak ukázala, že při geneticky indukované ektopické expresi Tim-3 v absenci ligandu Tim-3 naopak dochází k inhibici TCR signalizace. Tyto protichůdné závěry naznačují, že samotná exprese Tim-3 představuje velmi citlivý molekulární reostat, který dle aktuální situace může TCR signalizaci buď zvyšovat, nebo naopak inhibovat (Tomkowicz et al., 2015). Do této citlivosti může do značné míry promlouvat i fakt, že Tim-3 je součástí tzv. "lipidových raftů" (Clayton et al., 2014), které jsou velmi dynamické (Rajendran and Simons, 2005) a mechanisticky významně přispívají k regulaci receptorové signalizace (Varshney et al., 2016). Je možné tedy i spekulovat, že geneticky indukovaná ektopická exprese může v různých studijních modelech odlišně distribuovat Tim-3 do "lipidových raftů", a tím ovlivnit asociaci Tim-3 se signálními molekulami jako jsou fosfatázy (Clayton et al., 2014), nebo naopak kinázy (Lee et al., 2011). To může být v konečném důsledku rozhodující pro určení, zda Tim-3 bude potencovat, či inhibovat TCR signalizaci. V systému, který byl užit v této studii, bylo dosaženo odlišné

exprese Tim-3 pouze na základě přítomnosti či nepřítomnosti IL-2 v kultivačním médiu. Tato rozdílná exprese Tim-3 u *in vitro* připravených antigen specifických CD8⁺ T buněk neměla však zásadní vliv na jejich stimulaci, jelikož nebyl (alespoň v rozsahu provedených experimentů se třemi dárci v této práci) prokázán rozdíl v reaktivitě těchto buněk po stimulaci PC-3 buňkami (analyzovaná data nebyla prezentována).

Významným prvkem, který může být rozhodující v tom, jakým způsobem bude Tim-3 přispívat k TCR signalizaci, je to, zda TCR signalizace probíhá v přítomnosti či nepřítomnosti Tim-3 ligandu, jako je například Gal-9 (Clayton et al., 2014). Samotné PC-3 buňky, které byly použity v této studii pro stimulaci T buněk, téměř neexprimují Gal-9 (Laderach et al., 2013). Bylo proto užito rekombinantního Gal-9, který byl současně přidán během aktivace T buněk PC-3 buňkami. Výsledky ukázaly, že Gal-9 inhiboval reaktivitu stimulovaných CD8⁺ T buněk v tom smyslu, že došlo ke snížení velikosti CD8⁺ T buněčné populace, která na PC-3 buňky reagovala. Přestože snížení bylo v absolutních hodnotách skutečně malé, jen v řádu do deseti procent, bylo statisticky významné. V případě detekce antigenní stimulace skrze expresi TNF- α byl statisticky významný i rozdíl v reaktivitě mezi buňkami s IL-2 a bez IL-2 u vzorků stimulovaných v přítomnosti Gal-9. Tyto výsledky ukázaly, že míra reaktivity stimulovaných T buněk je více inhibována Gal-9 u buněk s vyšší expresí Tim-3. Protože v dané studii nebyly použity buňky bez exprese Tim-3, jako tomu bylo v jiných studiích (Lee et al., 2011; Tomkowicz et al., 2015), nelze tudíž úplně doložit, že inhibice byla zprostředkována pouze skrze Tim-3, protože Gal-9 může interagovat i s jinými receptory nezávisle na Tim-3 (Vaitaitis and Wagner, 2012; Wu et al., 2014). Zmíněné výsledky s Gal-9 je proto nutné, kvůli absenci kontrolních buněk bez exprese Tim-3, interpretovat jako korelační, a ne *a priori* kauzální.

Bez ohledu na funkčnost Tim-3 v různých studijních systémech se stále více ukazuje, že exprese Tim-3 hraje nepochybně významnou roli jak v prognóze nádorových onemocnění (Li et al., 2012; Su et al., 2018; Wu et al., 2017), tak i ve funkčnosti imunitních buněk s protinádorovou aktivitou (Das et al., 2017). Na Tim-3 se proto již dlouho soustředí pozornost jako na slibný kontrolní bod, který by mohl být cílem v terapii nádorových onemocnění (He et al., 2018). Bohužel, na rozdíl od známých kontrolních bodů, CTLA-4 a PD-1, které jsou predominantně exprimovány u imunitních buněk (Brunet et al., 1987; Keir et al., 2008), je Tim-3 exprimován v celé řadě buněk a tkání (Zhang et al., 2009). Jeho panspecifické cílení pro imunoterapeutické účely, jako je tomu u CTLA-4 a PD-1, není proto příliš reálné. Co se však zdá být reálné, je jeho cílení v *in vitro* biotechnologických postupech při produkci imunitních buněk pro aktivní či pasivní buněčnou imunoterapii. Nedávná studie

již ukázala, že použití PD-1 inhibitoru při *in vitro* expanzi TIL významně zvyšuje výtěžek expandovaných TIL (Hall et al., 2016). Tim-3 je rovněž silně exprimován u expandovaných TIL (Owens et al., 2018). Na rozdíl od PD-1 však může Tim-3 působit jako citlivý duální reostat při receptorové stimulaci (Clayton et al., 2014; Lee et al., 2011; Tomkowicz et al., 2015). Z nedávných studií zároveň vyplývá, že tento molekulární reostat významně rozhoduje nejen o samotné aktivaci, ale co je především podstatné, rovněž o celkovém výsledku dané aktivace (Avery et al., 2018; Sabins et al., 2017). Podle těchto studií je skrze Tim-3 možné ovlivnit fenotyp stimulovaných T buněk. U buněčné imunoterapie je zásadní právě výsledný fenotyp připravených imunitních buněk, jelikož do velké míry ovlivňuje terapeutickou účinnost daných buněk (Klebanoff et al., 2012). Zjištění, že IL-2 zásadně zvyšuje povrchovou expresi Tim-3 u CD8⁺ T buněk a že tato exprese je významně potlačena po odebrání IL-2 z buněčné kultury, nastoluje otázku, zdali by případná antigenní stimulace těchto buněk za účelem jejich další expanze pro terapeutické účely, například pomocí antigen prezentujících DC, nebyla výhodnější v nepřítomnosti IL-2, tedy na pozadí nízké povrchové exprese Tim-3. V takovém případě by nemuselo docházet k nasměrování expandujících buněk k diferenciaci do krátce žijících efektorových T buněk (Avery et al., 2018), jejichž terapeutický účinek je značně omezen (Klebanoff et al., 2012). Zodpovězení této otázky bude však vyžadovat další výzkum, který bude navazovat na tuto studii.

7 ZÁVĚR

Stále více studií indikuje, že Tim-3 hraje roli ve funkčnosti imunitních buněk s protinádorovými vlastnostmi a podílí se na celkové prognóze nádorových onemocnění. Zjištění, že skrze Tim-3 je možné ovlivnit fenotyp stimulovaných T buněk, podporuje to, že se Tim-3 jeví jako potenciálně slibný terapeutický cíl protinádorové buněčné imunoterapie.

Předmětem této diplomové práce bylo sledování role Tim-3 u *in vitro* expandovaných antigen specifických CD8⁺ T buněk. K tomu bylo potřeba vytvořit robustní a reprodučibilní protokol pro *in vitro* přípravu antigen specifických CD8⁺ T buněk, které na svém povrchu exprimují molekulu Tim-3. Příprava těchto buněk byla založena na netradičním postupu, kdy kultivaci v přítomnosti nádorových antigenů předcházela priming směsí alogenních DC. Použitím HLA-A2 inkompatibilních dárců DC se předpokládal vznik silné aloreaktivní reakce, vhodné pro nasměrování lymfocytů do Th1 typu odpovědi a senzitivace těchto lymfocytů vůči nádorovým antigenům. Optimalizací tohoto postupu pak bylo dosaženo významné expanze a obohacení dárcovských lymfocytů o antigen specifické CD8⁺ T buňky s vysokou povrchovou expresí Tim-3. Během studie bylo zjištěno, že exprese Tim-3 na povrchu expandovaných buněk závisí na přítomnosti IL-2 a že míra této exprese se odvíjí právě od koncentrace tohoto cytokinu. Zvýšení povrchové exprese Tim-3 bylo zároveň pozorováno již po krátkém působení IL-2. Dalším poznatkem této práce je reverzibilita exprese Tim-3, kdy po odstranění IL-2 z buněčné kultury došlo k významnému snížení exprese Tim-3 na povrchu expandovaných CD8⁺ T buněk. Nakonec bylo ve studii zjištěno, že přítomnost Gal-9, ligandu Tim-3, inhibuje aktivaci expandovaných CD8⁺ T buněk po jejich stimulaci PC-3 buňkami a že tato inhibice je vyšší u buněk kultivovaných a aktivovaných v přítomnosti IL-2, tedy u buněk s vyšší expresí Tim-3.

Souhrn poznatků této práce rozšiřuje dosud skromné znalosti v oblasti role inhibičních molekul u *in vitro* připravovaných buněk pro terapeutické účely nádorových onemocnění.

8 LITERATURA

- Abdulkareem**, I. H., and Zurmi, I. B. (2012). Review of hormonal treatment of breast cancer. *Nigerian journal of clinical practice* 15, 9-14.
- Aerts-Toegaert**, C., Heirman, C., Tuyaerts, S., Corthals, J., Aerts, J. L., Bonehill, A., Thielemans, K., and Breckpot, K. (2007). CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol* 37, 686-695.
- Afanasiev**, O. K., Yelistratova, L., Miller, N., Nagase, K., Paulson, K., Iyer, J. G., Ibrani, D., Koelle, D. M., and Nghiem, P. (2013). Merkel polyomavirus-specific T cells fluctuate with merkel cell carcinoma burden and express therapeutically targetable PD-1 and Tim-3 exhaustion markers. *Clin Cancer Res* 19, 5351-5360.
- Ahmadzadeh**, M., Johnson, L. A., Heemskerk, B., Wunderlich, J. R., Dudley, M. E., White, D. E., and Rosenberg, S. A. (2009). Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired. *Blood* 114, 1537-1544.
- Alieva**, M., van Rheenen, J., and Broekman, M. L. D. (2018). Potential impact of invasive surgical procedures on primary tumor growth and metastasis. *Clinical & experimental metastasis* 35, 319-331.
- Anderson**, A. C., Anderson, D. E., Bregoli, L., Hastings, W. D., Kassam, N., Lei, C., Chandwaskar, R., Karman, J., Su, E. W., Hirashima, M., *et al.* (2007). Promotion of tissue inflammation by the immune receptor Tim-3 expressed on innate immune cells. *Science* 318, 1141-1143.
- Anderson**, A. C., Joller, N., and Kuchroo, V. K. (2016). Lag-3, Tim-3, and TIGIT: Co-inhibitory Receptors with Specialized Functions in Immune Regulation. *Immunity* 44, 989-1004.
- Arruebo**, M., Vilaboa, N., Saez-Gutierrez, B., Lambea, J., Tres, A., Valladares, M., and Gonzalez-Fernandez, A. (2011). Assessment of the evolution of cancer treatment therapies. *Cancers* 3, 3279-3330.
- Attia**, P., Phan, G. Q., Maker, A. V., Robinson, M. R., Quezado, M. M., Yang, J. C., Sherry, R. M., Topalian, S. L., Kammula, U. S., Royal, R. E., *et al.* (2005). Autoimmunity correlates with tumor regression in patients with metastatic melanoma treated with anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23, 6043-6053.
- Avery**, L., Filderman, J., Szymczak-Workman, A. L., and Kane, L. P. (2018). Tim-3 co-stimulation promotes short-lived effector T cells, restricts memory precursors, and is dispensable for T cell exhaustion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 2455-2460.
- Awan**, A., and Esfahani, K. (2018). Endocrine therapy for breast cancer in the primary care setting. *Current oncology* 25, 285-291.
- Baldan**, V., Griffiths, R., Hawkins, R. E., and Gilham, D. E. (2015). Efficient and reproducible generation of tumour-infiltrating lymphocytes for renal cell carcinoma. *British journal of cancer* 112, 1510-1518.
- Banchereau**, J., Pascual, V., and O'Garra, A. (2012). From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Nat Immunol* 13, 925-931.
- Banerjee**, H., and Kane, L. P. (2018). Immune regulation by Tim-3. *F1000Research* 7, 316.
- Barber**, D. L., Wherry, E. J., Masopust, D., Zhu, B., Allison, J. P., Sharpe, A. H., Freeman, G. J., and Ahmed, R. (2006). Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439, 682-687.
- Baxter**, D. (2014). Active and passive immunization for cancer. *Human vaccines & immunotherapeutics* 10, 2123-2129.
- Bernt**, K. M., Ni, S., Gaggar, A., Li, Z. Y., Shayakhmetov, D. M., and Lieber, A. (2003). The effect of sequestration by nontarget tissues on anti-tumor efficacy of systemically applied,

conditionally replicating adenovirus vectors. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 8, 746-755.

Berraondo, P., Sanmamed, M. F., Ochoa, M. C., Etxeberria, I., Aznar, M. A., Perez-Gracia, J. L., Rodriguez-Ruiz, M. E., Ponz-Sarvisé, M., Castanon, E., and Melero, I. (2019). Cytokines in clinical cancer immunotherapy. *British journal of cancer* 120, 6-15.

Besser, M. J., Shapira-Frommer, R., and Schachter, J. (2015). Tumor-Infiltrating Lymphocytes: Clinical Experience. *Cancer journal* 21, 465-469.

Bevan, M. J. (2006). Cross-priming. *Nat Immunol* 7, 363-365.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians* 68, 394-424.

Brunet, J. F., Denizot, F., Luciani, M. F., Roux-Dosseto, M., Suzan, M., Mattei, M. G., and Golstein, P. (1987). A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* 328, 267-270.

Cai, C., Xu, Y. F., Wu, Z. J., Dong, Q., Li, M. Y., Olson, J. C., Rabinowitz, Y. M., Wang, L. H., and Sun, Y. (2016). Tim-3 expression represents dysfunctional tumor infiltrating T cells in renal cell carcinoma. *World journal of urology* 34, 561-567.

Cameron, B. J., Gerry, A. B., Dukes, J., Harper, J. V., Kannan, V., Bianchi, F. C., Grand, F., Brewer, J. E., Gupta, M., Plesa, G., *et al.* (2013). Identification of a Titin-derived HLA-A1-presented peptide as a cross-reactive target for engineered MAGE A3-directed T cells. *Science translational medicine* 5, 197ra103.

Cannon, M. J., Block, M. S., Morehead, L. C., and Knutson, K. L. (2019). The evolving clinical landscape for dendritic cell vaccines and cancer immunotherapy. *Immunotherapy* 11, 75-79.

Carlsson, B., Sadeghi, A., Bengtsson, M., Wagenius, G., and Totterman, T. H. (2008). Effector T cell analysis of melanoma tumor-infiltrating lymphocyte cultures using HLA-ABC semimatched melanoma cell lines. *Journal of immunotherapy* 31, 633-643.

Castellino, F., Huang, A. Y., Altan-Bonnet, G., Stoll, S., Scheinecker, C., and Germain, R. N. (2006). Chemokines enhance immunity by guiding naive CD8⁺ T cells to sites of CD4⁺ T cell-dendritic cell interaction. *Nature* 440, 890-895.

Cheever, M. A., and Higano, C. S. (2011). PROVENGE (Sipuleucel-T) in prostate cancer: the first FDA-approved therapeutic cancer vaccine. *Clin Cancer Res* 17, 3520-3526.

Chen, H. H. W., and Kuo, M. T. (2017). Improving radiotherapy in cancer treatment: Promises and challenges. *Oncotarget* 8, 62742-62758.

Chiba, S., Baghdadi, M., Akiba, H., Yoshiyama, H., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., Fujioka, Y., Ohba, Y., Gorman, J. V., Colgan, J. D., *et al.* (2012). Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1. *Nat Immunol* 13, 832-842.

Choi, I. K., Lee, J. S., Zhang, S. N., Park, J., Sonn, C. H., Lee, K. M., and Yun, C. O. (2011). Oncolytic adenovirus co-expressing IL-12 and IL-18 improves tumor-specific immunity via differentiation of T cells expressing IL-12Rbeta2 or IL-18Ralpha. *Gene therapy* 18, 898-909.

Chuk, M. K., Chang, J. T., Theoret, M. R., Sampene, E., He, K., Weis, S. L., Helms, W. S., Jin, R., Li, H., Yu, J., *et al.* (2017). FDA Approval Summary: Accelerated Approval of Pembrolizumab for Second-Line Treatment of Metastatic Melanoma. *Clin Cancer Res* 23, 5666-5670.

Clayton, K. L., Haaland, M. S., Douglas-Vail, M. B., Mujib, S., Chew, G. M., Ndhlovu, L. C., and Ostrowski, M. A. (2014). T cell Ig and mucin domain-containing protein 3 is recruited to the immune synapse, disrupts stable synapse formation, and associates with receptor phosphatases. *J Immunol* 192, 782-791.

- Cohen**, N. R., Garg, S., and Brenner, M. B. (2009). Antigen Presentation by CD1 Lipids, T Cells, and NKT Cells in Microbial Immunity. *Advances in immunology* 102, 1-94.
- Conry**, R. M., Westbrook, B., McKee, S., and Norwood, T. G. (2018). Talimogene laherparepvec: First in class oncolytic virotherapy. *Human vaccines & immunotherapeutics* 14, 839-846.
- Constantino**, J., Gomes, C., Falcao, A., Cruz, M. T., and Neves, B. M. (2016). Antitumor dendritic cell-based vaccines: lessons from 20 years of clinical trials and future perspectives. *Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine* 168, 74-95.
- Croce**, C. M., Zhang, K., and Wei, Y. Q. (2016). Announcing Signal Transduction and Targeted Therapy. *Signal transduction and targeted therapy* 1, 15006.
- Dalod**, M., Chelbi, R., Malissen, B., and Lawrence, T. (2014). Dendritic cell maturation: functional specialization through signaling specificity and transcriptional programming. *EMBO J* 33, 1104-1116.
- Das**, M., Zhu, C., and Kuchroo, V. K. (2017). Tim-3 and its role in regulating anti-tumor immunity. *Immunol Rev* 276, 97-111.
- DeKruyff**, R. H., Bu, X., Ballesteros, A., Santiago, C., Chim, Y. L., Lee, H. H., Karisola, P., Pichavant, M., Kaplan, G. G., Umetsu, D. T., *et al.* (2010). T cell/transmembrane, Ig, and mucin-3 allelic variants differentially recognize phosphatidylserine and mediate phagocytosis of apoptotic cells. *J Immunol* 184, 1918-1930.
- Denmeade**, S. R., and Isaacs, J. T. (2002). A history of prostate cancer treatment. *Nature reviews Cancer* 2, 389-396.
- Dharmadhikari**, N., Mehnert, J. M., and Kaufman, H. L. (2015). Oncolytic virus immunotherapy for melanoma. *Current treatment options in oncology* 16, 326.
- Dine**, J., Gordon, R., Shames, Y., Kasler, M. K., and Barton-Burke, M. (2017). Immune Checkpoint Inhibitors: An Innovation in Immunotherapy for the Treatment and Management of Patients with Cancer. *Asia-Pacific journal of oncology nursing* 4, 127-135.
- Du**, W., Yang, M., Turner, A., Xu, C., Ferris, R. L., Huang, J., Kane, L. P., and Lu, B. (2017). TIM-3 as a Target for Cancer Immunotherapy and Mechanisms of Action. *International journal of molecular sciences* 18.
- Dudek**, A. M., Martin, S., Garg, A. D., and Agostinis, P. (2013). Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity. *Frontiers in immunology* 4, 438.
- Durand**, S., and Cimorelli, A. (2011). The inside out of lentiviral vectors. *Viruses* 3, 132-159.
- Durgeau**, A., Virk, Y., Corgnac, S., and Mami-Chouaib, F. (2018). Recent Advances in Targeting CD8 T-Cell Immunity for More Effective Cancer Immunotherapy. *Frontiers in immunology* 9, 14.
- Dzopalic**, T., Rajkovic, I., Dragicevic, A., and Colic, M. (2012). The response of human dendritic cells to co-ligation of pattern-recognition receptors. *Immunol Res* 52, 20-33.
- Eagar**, T. N., Karandikar, N. J., Bluestone, J. A., and Miller, S. D. (2002). The role of CTLA-4 in induction and maintenance of peripheral T cell tolerance. *Eur J Immunol* 32, 972-981.
- Edukulla**, R., Woller, N., Mundt, B., Knocke, S., Gurlevik, E., Saborowski, M., Malek, N., Manns, M. P., Wirth, T., Kuhnel, F., and Kubicka, S. (2009). Antitumoral immune response by recruitment and expansion of dendritic cells in tumors infected with telomerase-dependent oncolytic viruses. *Cancer Res* 69, 1448-1458.
- Eigentler**, T. K., Hassel, J. C., Berking, C., Aberle, J., Bachmann, O., Grunwald, V., Kahler, K. C., Loquai, C., Reinmuth, N., Steins, M., *et al.* (2016). Diagnosis, monitoring and management of immune-related adverse drug reactions of anti-PD-1 antibody therapy. *Cancer treatment reviews* 45, 7-18.
- Farkona**, S., Diamandis, E. P., and Blasutig, I. M. (2016). Cancer immunotherapy: the beginning of the end of cancer? *BMC medicine* 14, 73.

- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Dyba, T., Randi, G., Bettio, M., Gavin, A., Visser, O., and Bray, F. (2018).** Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018. *European journal of cancer* *103*, 356-387.
- Fesnak, A. D., June, C. H., and Levine, B. L. (2016).** Engineered T cells: the promise and challenges of cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer* *16*, 566-581.
- Filley, A. C., and Dey, M. (2017).** Dendritic cell based vaccination strategy: an evolving paradigm. *Journal of neuro-oncology* *133*, 223-235.
- Fisher, K. D., Stallwood, Y., Green, N. K., Ulbrich, K., Mautner, V., and Seymour, L. W. (2001).** Polymer-coated adenovirus permits efficient retargeting and evades neutralising antibodies. *Gene therapy* *8*, 341-348.
- Florcken, A., Kopp, J., van Lessen, A., Movassaghi, K., Takvorian, A., Johrens, K., Mobs, M., Schonemann, C., Sawitzki, B., Egerer, K., *et al.* (2013).** Allogeneic partially HLA-matched dendritic cells pulsed with autologous tumor cell lysate as a vaccine in metastatic renal cell cancer: a clinical phase I/II study. *Human vaccines & immunotherapeutics* *9*, 1217-1227.
- Forget, M. A., Malu, S., Liu, H., Toth, C., Maiti, S., Kale, C., Haymaker, C., Bernatchez, C., Huls, H., Wang, E., *et al.* (2014).** Activation and propagation of tumor-infiltrating lymphocytes on clinical-grade designer artificial antigen-presenting cells for adoptive immunotherapy of melanoma. *Journal of immunotherapy* *37*, 448-460.
- Franke, V., Berger, D. M. S., Klop, W. M. C., van der Hiel, B., van de Wiel, B. A., Ter Meulen, S., Wouters, M., van Houdt, W. J., and van Akkooi, A. C. J. (2019).** High response rates for T-VEC in early metastatic melanoma (stage IIIB/C-IVM1a). *Int J Cancer* *145*, 974-978.
- Gabrilovich, D. (2004).** Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* *4*, 941-952.
- Gajewski, T. F., Meng, Y., Blank, C., Brown, I., Kacha, A., Kline, J., and Harlin, H. (2006).** Immune resistance orchestrated by the tumor microenvironment. *Immunol Rev* *213*, 131-145.
- Galluzzi, L., Vacchelli, E., Bravo-San Pedro, J. M., Buque, A., Senovilla, L., Baracco, E. E., Bloy, N., Castoldi, F., Abastado, J. P., Agostinis, P., *et al.* (2014).** Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget* *5*, 12472-12508.
- Garcia-Diaz, A., Shin, D. S., Moreno, B. H., Saco, J., Escuin-Ordinas, H., Rodriguez, G. A., Zaretsky, J. M., Sun, L., Hugo, W., Wang, X., *et al.* (2017).** Interferon Receptor Signaling Pathways Regulating PD-L1 and PD-L2 Expression. *Cell reports* *19*, 1189-1201.
- Garg, A. D., More, S., Rufo, N., Mece, O., Sassano, M. L., Agostinis, P., Zitvogel, L., Kroemer, G., and Galluzzi, L. (2017).** Trial watch: Immunogenic cell death induction by anticancer chemotherapeutics. *Oncoimmunology* *6*, e1386829.
- Garrido, F., Aptsiauri, N., Doorduijn, E. M., Garcia Lora, A. M., and van Hall, T. (2016).** The urgent need to recover MHC class I in cancers for effective immunotherapy. *Curr Opin Immunol* *39*, 44-51.
- Gattinoni, L., Powell, D. J., Jr., Rosenberg, S. A., and Restifo, N. P. (2006).** Adoptive immunotherapy for cancer: building on success. *Nat Rev Immunol* *6*, 383-393.
- Gatzka, M. V. (2018).** Targeted Tumor Therapy Remixed-An Update on the Use of Small-Molecule Drugs in Combination Therapies. *Cancers* *10*.
- Gervais, A., Eymard, J. C., Toulmonde, E., and Bernard, J. (2009).** Selected allogeneic dendritic cells markedly enhance human tumour antigen-specific T cell response in vitro. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII *58*, 1831-1841.
- Gilham, D. E., Anderson, J., Bridgeman, J. S., Hawkins, R. E., Exley, M. A., Stauss, H., Maher, J., Pule, M., Sewell, A. K., Bendle, G., *et al.* (2015).** Adoptive T-cell therapy for cancer in the United kingdom: a review of activity for the British Society of Gene and Cell Therapy annual meeting 2015. *Human gene therapy* *26*, 276-285.

Gleason, M. K., Lenvik, T. R., McCullar, V., Felices, M., O'Brien, M. S., Cooley, S. A., Verneris, M. R., Cichocki, F., Holman, C. J., Panoskaltsis-Mortari, A., et al. (2012). Tim-3 is an inducible human natural killer cell receptor that enhances interferon gamma production in response to galectin-9. *Blood* 119, 3064-3072.

Goedegebuure, P. S., Douville, L. M., Li, H., Richmond, G. C., Schoof, D. D., Scavone, M., and Eberlein, T. J. (1995). Adoptive immunotherapy with tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in patients with metastatic malignant melanoma and renal cell carcinoma: a pilot study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 13, 1939-1949.

Golden-Mason, L., Palmer, B. E., Kassam, N., Townshend-Bulson, L., Livingston, S., McMahon, B. J., Castelblanco, N., Kuchroo, V., Gretch, D. R., and Rosen, H. R. (2009). Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4+ and CD8+ T cells. *J Virol* 83, 9122-9130.

Gross, G., Waks, T., and Eshhar, Z. (1989). Expression of immunoglobulin-T-cell receptor chimeric molecules as functional receptors with antibody-type specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 10024-10028.

Hall, M., Liu, H., Malafa, M., Centeno, B., Hodul, P. J., Pimiento, J., Pilon-Thomas, S., and Sarnaik, A. A. (2016). Expansion of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) from human pancreatic tumors. *Journal for immunotherapy of cancer* 4, 61.

Hanna, R. K., and Soper, J. T. (2010). The role of surgery and radiation therapy in the management of gestational trophoblastic disease. *The oncologist* 15, 593-600.

Hargadon, K. M., Johnson, C. E., and Williams, C. J. (2018). Immune checkpoint blockade therapy for cancer: An overview of FDA-approved immune checkpoint inhibitors. *International immunopharmacology* 62, 29-39.

He, Y., Cao, J., Zhao, C., Li, X., Zhou, C., and Hirsch, F. R. (2018). TIM-3, a promising target for cancer immunotherapy. *OncoTargets and therapy* 11, 7005-7009.

Heath, W. R., and Carbone, F. R. (2001). Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. *Nat Rev Immunol* 1, 126-134.

Hinrichs, C. S., and Rosenberg, S. A. (2014). Exploiting the curative potential of adoptive T-cell therapy for cancer. *Immunol Rev* 257, 56-71.

Hodi, F. S., O'Day, S. J., McDermott, D. F., Weber, R. W., Sosman, J. A., Haanen, J. B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J. C., et al. (2010). Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* 363, 711-723.

Hu, Z., Molloy, M. J., and Usherwood, E. J. (2016). CD4(+) T-cell dependence of primary CD8(+) T-cell response against vaccinia virus depends upon route of infection and viral dose. *Cellular & molecular immunology* 13, 82-93.

Huang, F. P., Platt, N., Wykes, M., Major, J. R., Powell, T. J., Jenkins, C. D., and MacPherson, G. G. (2000). A discrete subpopulation of dendritic cells transports apoptotic intestinal epithelial cells to T cell areas of mesenteric lymph nodes. *J Exp Med* 191, 435-444.

Huang, Y. H., Zhu, C., Kondo, Y., Anderson, A. C., Gandhi, A., Russell, A., Dougan, S. K., Petersen, B. S., Melum, E., Pertel, T., et al. (2015). CEACAM1 regulates TIM-3-mediated tolerance and exhaustion. *Nature* 517, 386-390.

Hui, E. (2019). Immune checkpoint inhibitors. *J Cell Biol* 218, 740-741.

Ikeda, K., Wakimoto, H., Ichikawa, T., Jhung, S., Hochberg, F. H., Louis, D. N., and Chiocca, E. A. (2000). Complement depletion facilitates the infection of multiple brain tumors by an intravascular, replication-conditional herpes simplex virus mutant. *J Virol* 74, 4765-4775.

Jackson, H. J., Rafiq, S., and Brentjens, R. J. (2016). Driving CAR T-cells forward. *Nat Rev Clin Oncol* 13, 370-383.

- Jan, M., Chao, M. P., Cha, A. C., Alizadeh, A. A., Gentles, A. J., Weissman, I. L., and Majeti, R. (2011).** Prospective separation of normal and leukemic stem cells based on differential expression of TIM3, a human acute myeloid leukemia stem cell marker. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 5009-5014.
- Japp, A. S., Kursunel, M. A., Meier, S., Malzer, J. N., Li, X., Rahman, N. A., Jekabsons, W., Krause, H., Magheli, A., Klopff, C., *et al.* (2015).** Dysfunction of PSA-specific CD8⁺ T cells in prostate cancer patients correlates with CD38 and Tim-3 expression. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* *64*, 1487-1494.
- Jiang, T., Zhou, C., and Ren, S. (2016).** Role of IL-2 in cancer immunotherapy. *Oncoimmunology* *5*, e1163462.
- Jin, C., Yu, D., Hillerdal, V., Wallgren, A., Karlsson-Parra, A., and Essand, M. (2014).** Allogeneic lymphocyte-licensed DCs expand T cells with improved antitumor activity and resistance to oxidative stress and immunosuppressive factors. *Molecular therapy Methods & clinical development* *1*, 14001.
- Jin, H. T., Ahmed, R., and Okazaki, T. (2011).** Role of PD-1 in regulating T-cell immunity. *Current topics in microbiology and immunology* *350*, 17-37.
- Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A., and Amigorena, S. (2012).** Cross-presentation by dendritic cells. *Nat Rev Immunol* *12*, 557-569.
- Johnson, L. A., Morgan, R. A., Dudley, M. E., Cassard, L., Yang, J. C., Hughes, M. S., Kammula, U. S., Royal, R. E., Sherry, R. M., Wunderlich, J. R., *et al.* (2009).** Gene therapy with human and mouse T-cell receptors mediates cancer regression and targets normal tissues expressing cognate antigen. *Blood* *114*, 535-546.
- Jones, R. B., Ndhlovu, L. C., Barbour, J. D., Sheth, P. M., Jha, A. R., Long, B. R., Wong, J. C., Satkunarajah, M., Schweneker, M., Chapman, J. M., *et al.* (2008).** Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J Exp Med* *205*, 2763-2779.
- Josefowicz, S. Z., Lu, L. F., and Rudensky, A. Y. (2012).** Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* *30*, 531-564.
- Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F., and Jones, L. W. (1979).** Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Investigative urology* *17*, 16-23.
- Kaiko, G. E., Horvat, J. C., Beagley, K. W., and Hansbro, P. M. (2008).** Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* *123*, 326-338.
- Kang, C. W., Dutta, A., Chang, L. Y., Mahalingam, J., Lin, Y. C., Chiang, J. M., Hsu, C. Y., Huang, C. T., Su, W. T., Chu, Y. Y., and Lin, C. Y. (2015).** Apoptosis of tumor infiltrating effector TIM-3⁺CD8⁺ T cells in colon cancer. *Scientific reports* *5*, 15659.
- Kastenmuller, W., Gasteiger, G., Subramanian, N., Sparwasser, T., Busch, D. H., Belkaid, Y., Drexler, I., and Germain, R. N. (2011).** Regulatory T cells selectively control CD8⁺ T cell effector pool size via IL-2 restriction. *J Immunol* *187*, 3186-3197.
- Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J., and Sharpe, A. H. (2008).** PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* *26*, 677-704.
- Khademi, M., Illes, Z., Gielen, A. W., Marta, M., Takazawa, N., Baecher-Allan, C., Brundin, L., Hannerz, J., Martin, C., Harris, R. A., *et al.* (2004).** T Cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-3 (TIM-3) and TIM-1 molecules are differentially expressed on human Th1 and Th2 cells and in cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis. *J Immunol* *172*, 7169-7176.
- Kikushige, Y., Miyamoto, T., Yuda, J., Jabbarzadeh-Tabrizi, S., Shima, T., Takayanagi, S., Niino, H., Yurino, A., Miyawaki, K., Takenaka, K., *et al.* (2015).** A TIM-3/Gal-9 Autocrine

Stimulatory Loop Drives Self-Renewal of Human Myeloid Leukemia Stem Cells and Leukemic Progression. *Cell stem cell* 17, 341-352.

Klebanoff, C. A., Gattinoni, L., and Restifo, N. P. (2012). Sorting through subsets: which T-cell populations mediate highly effective adoptive immunotherapy? *Journal of immunotherapy* 35, 651-660.

Klune, J. R., Dhupar, R., Cardinal, J., Billiar, T. R., and Tsung, A. (2008). HMGB1: endogenous danger signaling. *Molecular medicine* 14, 476-484.

Koguchi, K., Anderson, D. E., Yang, L., O'Connor, K. C., Kuchroo, V. K., and Hafler, D. A. (2006). Dysregulated T cell expression of TIM3 in multiple sclerosis. *J Exp Med* 203, 1413-1418.

Kuwana, Y., Asakura, Y., Utsunomiya, N., Nakanishi, M., Arata, Y., Itoh, S., Nagase, F., and Kurosawa, Y. (1987). Expression of chimeric receptor composed of immunoglobulin-derived V regions and T-cell receptor-derived C regions. *Biochemical and biophysical research communications* 149, 960-968.

Labrie, F. (2010). Hormonal therapy of prostate cancer. *Progress in brain research* 182, 321-341.

Laderach, D. J., Gentilini, L. D., Giribaldi, L., Delgado, V. C., Nugnes, L., Croci, D. O., Al Nakouzi, N., Sacca, P., Casas, G., Mazza, O., *et al.* (2013). A unique galectin signature in human prostate cancer progression suggests galectin-1 as a key target for treatment of advanced disease. *Cancer Res* 73, 86-96.

Lambert, J. M., and Berkenblit, A. (2018). Antibody-Drug Conjugates for Cancer Treatment. *Annual review of medicine* 69, 191-207.

Landsberg, J., Kohlmeyer, J., Renn, M., Bald, T., Rogava, M., Cron, M., Fatho, M., Lennerz, V., Wölfel, T., Hölzel, M., and Tüting, T. (2012). Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature* 490, 412-416.

Lapteva, N., Aldrich, M., Weksberg, D., Rollins, L., Goltsova, T., Chen, S. Y., and Huang, X. F. (2009). Targeting the intratumoral dendritic cells by the oncolytic adenoviral vaccine expressing RANTES elicits potent antitumor immunity. *Journal of immunotherapy* 32, 145-156.

Laurell, A., Lonnemark, M., Brekkan, E., Magnusson, A., Tolf, A., Wallgren, A. C., Andersson, B., Adamson, L., Kiessling, R., and Karlsson-Parra, A. (2017). Intratumorally injected pro-inflammatory allogeneic dendritic cells as immune enhancers: a first-in-human study in unfavourable risk patients with metastatic renal cell carcinoma. *Journal for immunotherapy of cancer* 5, 52.

Lee, A. W., Truong, T., Bickham, K., Fonteneau, J. F., Larsson, M., Da Silva, I., Somersan, S., Thomas, E. K., and Bhardwaj, N. (2002). A clinical grade cocktail of cytokines and PGE2 results in uniform maturation of human monocyte-derived dendritic cells: implications for immunotherapy. *Vaccine* 20 Suppl 4, A8-A22.

Lee, J., Su, E. W., Zhu, C., Hainline, S., Phuah, J., Moroco, J. A., Smithgall, T. E., Kuchroo, V. K., and Kane, L. P. (2011). Phosphotyrosine-dependent coupling of Tim-3 to T-cell receptor signaling pathways. *Mol Cell Biol* 31, 3963-3974.

Lepor, H., and Shore, N. D. (2012). LHRH Agonists for the Treatment of Prostate Cancer: 2012. *Reviews in urology* 14, 1-12.

Li, G., Liang, X., and Lotze, M. T. (2013). HMGB1: The Central Cytokine for All Lymphoid Cells. *Frontiers in immunology* 4, 68.

Li, H., Wu, K., Tao, K., Chen, L., Zheng, Q., Lu, X., Liu, J., Shi, L., Liu, C., Wang, G., and Zou, W. (2012). Tim-3/galectin-9 signaling pathway mediates T-cell dysfunction and predicts poor prognosis in patients with hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 56, 1342-1351.

- Lin, Z., Zhang, Q., and Luo, W. (2016).** Angiogenesis inhibitors as therapeutic agents in cancer: Challenges and future directions. *European journal of pharmacology* 793, 76-81.
- Linsley, P. S., Greene, J. L., Brady, W., Bajorath, J., Ledbetter, J. A., and Peach, R. (1994).** Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* 1, 793-801.
- Liu, Y., Shu, Q., Gao, L., Hou, N., Zhao, D., Liu, X., Zhang, X., Xu, L., Yue, X., Zhu, F., *et al.* (2010).** Increased Tim-3 expression on peripheral lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis negatively correlates with disease activity. *Clinical immunology* 137, 288-295.
- Lotze, M. T., Chang, A. E., Seipp, C. A., Simpson, C., Vetto, J. T., and Rosenberg, S. A. (1986).** High-dose recombinant interleukin 2 in the treatment of patients with disseminated cancer. Responses, treatment-related morbidity, and histologic findings. *JAMA* 256, 3117-3124.
- Ma, C. J., Li, G. Y., Cheng, Y. Q., Wang, J. M., Ying, R. S., Shi, L., Wu, X. Y., Niki, T., Hirashima, M., Li, C. F., *et al.* (2013).** Cis association of galectin-9 with Tim-3 differentially regulates IL-12/IL-23 expressions in monocytes via TLR signaling. *PLoS One* 8, e72488.
- Maas, K. W., El Sharouni, S. Y., Smit, E. F., and Schramel, F. M. (2007).** Sequencing chemotherapy, radiotherapy and surgery in combined modality treatment of stage III nonsmall cell lung cancer. *Current opinion in pulmonary medicine* 13, 297-304.
- Macaskill, E. J., Renshaw, L., and Dixon, J. M. (2006).** Neoadjuvant use of hormonal therapy in elderly patients with early or locally advanced hormone receptor-positive breast cancer. *The oncologist* 11, 1081-1088.
- Marelli, G., Howells, A., Lemoine, N. R., and Wang, Y. (2018).** Oncolytic Viral Therapy and the Immune System: A Double-Edged Sword Against Cancer. *Frontiers in immunology* 9, 866.
- McCarthy, E. F. (2006).** The toxins of William B. Coley and the treatment of bone and soft-tissue sarcomas. *The Iowa orthopaedic journal* 26, 154-158.
- Mellman, I., and Steinman, R. M. (2001).** Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106, 255-258.
- Merhavi-Shoham, E., Itzhaki, O., Markel, G., Schachter, J., and Besser, M. J. (2017).** Adoptive Cell Therapy for Metastatic Melanoma. *Cancer journal* 23, 48-53.
- Mocellin, S., Mandruzzato, S., Bronte, V., and Marincola, F. M. (2004).** Cancer vaccines: pessimism in check. *Nat Med* 10, 1278-1279; author reply 1279-1280.
- Mohammadizad, H., Shahbazi, M., Hasanjan Roushan, M. R., Soltanzadeh-Yamchi, M., and Mohammadnia-Afrouzi, M. (2019).** TIM-3 as a marker of exhaustion in CD8(+) T cells of active chronic hepatitis B patients. *Microbial pathogenesis* 128, 323-328.
- Mollanoori, H., Shahraki, H., Rahmati, Y., and Teimourian, S. (2018).** CRISPR/Cas9 and CAR-T cell, collaboration of two revolutionary technologies in cancer immunotherapy, an instruction for successful cancer treatment. *Human immunology* 79, 876-882.
- Monney, L., Sabatos, C. A., Gaglia, J. L., Ryu, A., Waldner, H., Chernova, T., Manning, S., Greenfield, E. A., Coyle, A. J., Sobel, R. A., *et al.* (2002).** Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature* 415, 536-541.
- Morgan, R. A., Chinnasamy, N., Abate-Daga, D., Gros, A., Robbins, P. F., Zheng, Z., Dudley, M. E., Feldman, S. A., Yang, J. C., Sherry, R. M., *et al.* (2013).** Cancer regression and neurological toxicity following anti-MAGE-A3 TCR gene therapy. *Journal of immunotherapy* 36, 133-151.
- Morgan, R. A., Dudley, M. E., and Rosenberg, S. A. (2010).** Adoptive cell therapy: genetic modification to redirect effector cell specificity. *Cancer journal* 16, 336-341.

- Morgan**, R. A., Dudley, M. E., Wunderlich, J. R., Hughes, M. S., Yang, J. C., Sherry, R. M., Royal, R. E., Topalian, S. L., Kammula, U. S., Restifo, N. P., *et al.* (2006). Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science* *314*, 126-129.
- Morimoto**, K., Hosomi, S., Yamagami, H., Watanabe, K., Kamata, N., Sogawa, M., Machida, H., Okazaki, H., Tanigawa, T., Nagahara, H., *et al.* (2011). Dysregulated upregulation of T-cell immunoglobulin and mucin domain-3 on mucosal T helper 1 cells in patients with Crohn's disease. *Scandinavian journal of gastroenterology* *46*, 701-709.
- Mujib**, S., Jones, R. B., Lo, C., Aidarus, N., Clayton, K., Sakhdari, A., Benko, E., Kovacs, C., and Ostrowski, M. A. (2012). Antigen-independent induction of Tim-3 expression on human T cells by the common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 is associated with proliferation and is dependent on the phosphoinositide 3-kinase pathway. *J Immunol* *188*, 3745-3756.
- Mullard**, A. (2015). 2014 FDA drug approvals. *Nat Rev Drug Discov* *14*, 77-81.
- Murphy**, C. C., Bartholomew, L. K., Carpentier, M. Y., Bluethmann, S. M., and Vernon, S. W. (2012). Adherence to adjuvant hormonal therapy among breast cancer survivors in clinical practice: a systematic review. *Breast Cancer Res Treat* *134*, 459-478.
- Murphy**, J. F. (2010). Trends in cancer immunotherapy. *Clinical Medicine Insights Oncology* *4*, 67-80.
- Myers**, G. (2018). Immune-related adverse events of immune checkpoint inhibitors: a brief review. *Current oncology* *25*, 342-347.
- Nakayama**, M., Akiba, H., Takeda, K., Kojima, Y., Hashiguchi, M., Azuma, M., Yagita, H., and Okumura, K. (2009). Tim-3 mediates phagocytosis of apoptotic cells and cross-presentation. *Blood* *113*, 3821-3830.
- Ning**, Y. M., Suzman, D., Maher, V. E., Zhang, L., Tang, S., Ricks, T., Palmby, T., Fu, W., Liu, Q., Goldberg, K. B., *et al.* (2017). FDA Approval Summary: Atezolizumab for the Treatment of Patients with Progressive Advanced Urothelial Carcinoma after Platinum-Containing Chemotherapy. *The oncologist* *22*, 743-749.
- Noone** AM, H. N., Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds) (2018). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2015, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2015/, based on November 2017 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2018.
- O'Neill**, H. C. (1988). Restricted blocking of cytotoxic T-cell function by anti-H-2K/D antibodies. *Immunology* *63*, 241-246.
- Ochoa**, M. C., Minute, L., Rodriguez, I., Garasa, S., Perez-Ruiz, E., Inoges, S., Melero, I., and Berraondo, P. (2017). Antibody-dependent cell cytotoxicity: immunotherapy strategies enhancing effector NK cells. *Immunology and cell biology* *95*, 347-355.
- Ohtake**, J., Ohkuri, T., Togashi, Y., Kitamura, H., Okuno, K., and Nishimura, T. (2014). Identification of novel helper epitope peptides of Survivin cancer-associated antigen applicable to developing helper/killer-hybrid epitope long peptide cancer vaccine. *Immunology letters* *161*, 20-30.
- Owens**, G. L., Price, M. J., Cheadle, E. J., Hawkins, R. E., Gilham, D. E., and Edmondson, R. J. (2018). Ex vivo expanded tumour-infiltrating lymphocytes from ovarian cancer patients release anti-tumour cytokines in response to autologous primary ovarian cancer cells. *Cancer immunology, immunotherapy* : CII *67*, 1519-1531.
- Padma**, V. V. (2015). An overview of targeted cancer therapy. *BioMedicine* *5*, 19.
- Papaioannou**, N. E., Beniata, O. V., Vitsos, P., Tsitsilonis, O., and Samara, P. (2016). Harnessing the immune system to improve cancer therapy. *Annals of translational medicine* *4*, 261.
- Pardoll**, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature reviews Cancer* *12*, 252-264.

- Park, J. J., Omiya, R., Matsumura, Y., Sakoda, Y., Kuramasu, A., Augustine, M. M., Yao, S., Tsushima, F., Narazaki, H., Anand, S., et al.** (2010). B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance. *Blood* 116, 1291-1298.
- Parviainen, S., Ahonen, M., Diaconu, I., Kipar, A., Siurala, M., Vaha-Koskela, M., Kanerva, A., Cerullo, V., and Hemminki, A.** (2015). GMCSF-armed vaccinia virus induces an antitumor immune response. *Int J Cancer* 136, 1065-1072.
- Pecorino, L.** (2005). *Molecular Biology Of Cancer: Mechanisms, Targets, And Therapeutics*. Oxford University Press, ISBN 0199264724.
- Peggs, K. S., Quezada, S. A., Chambers, C. A., Korman, A. J., and Allison, J. P.** (2009). Blockade of CTLA-4 on both effector and regulatory T cell compartments contributes to the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies. *J Exp Med* 206, 1717-1725.
- Perica, K., Varela, J. C., Oelke, M., and Schneck, J.** (2015). Adoptive T cell immunotherapy for cancer. *Rambam Maimonides medical journal* 6, e0004.
- Pinzon-Charry, A., Maxwell, T., and Lopez, J. A.** (2005). Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression. *Immunology and cell biology* 83, 451-461.
- Post, D. E., Sandberg, E. M., Kyle, M. M., Devi, N. S., Brat, D. J., Xu, Z., Tighiouart, M., and Van Meir, E. G.** (2007). Targeted cancer gene therapy using a hypoxia inducible factor dependent oncolytic adenovirus armed with interleukin-4. *Cancer Res* 67, 6872-6881.
- Postow, M. A., Sidlow, R., and Hellmann, M. D.** (2018). Immune-Related Adverse Events Associated with Immune Checkpoint Blockade. *The New England journal of medicine* 378, 158-168.
- Prokhorov, A., Gibbs, B. F., Bardelli, M., Ruegg, L., Fasler-Kan, E., Varani, L., and Sumbayev, V. V.** (2015). The immune receptor Tim-3 mediates activation of PI3 kinase/mTOR and HIF-1 pathways in human myeloid leukaemia cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* 59, 11-20.
- Rajendran, L., and Simons, K.** (2005). Lipid rafts and membrane dynamics. *J Cell Sci* 118, 1099-1102.
- Rangachari, M., Zhu, C., Sakuishi, K., Xiao, S., Karman, J., Chen, A., Angin, M., Wakeham, A., Greenfield, E. A., Sobel, R. A., et al.** (2012). Bat3 promotes T cell responses and autoimmunity by repressing Tim-3-mediated cell death and exhaustion. *Nat Med* 18, 1394-1400.
- Rapoport, A. P., Stadtmauer, E. A., Binder-Scholl, G. K., Goloubeva, O., Vogl, D. T., Lacey, S. F., Badros, A. Z., Garfall, A., Weiss, B., Finklestein, J., et al.** (2015). NY-ESO-1-specific TCR-engineered T cells mediate sustained antigen-specific antitumor effects in myeloma. *Nat Med* 21, 914-921.
- Reis e Sousa, C.** (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 6, 476-483.
- Ribas, A., and Wolchok, J. D.** (2018). Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* 359, 1350-1355.
- Riley, J. L., and June, C. H.** (2005). The CD28 family: a T-cell rheostat for therapeutic control of T-cell activation. *Blood* 105, 13-21.
- Rohaan, M. W., van den Berg, J. H., Kvistborg, P., and Haanen, J.** (2018). Adoptive transfer of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a viable treatment option. *Journal for immunotherapy of cancer* 6, 102.
- Rosenberg, S. A., Lotze, M. T., Muul, L. M., Leitman, S., Chang, A. E., Ettinghausen, S. E., Matory, Y. L., Skibber, J. M., Shiloni, E., Vetto, J. T., and et al.** (1985). Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer. *The New England journal of medicine* 313, 1485-1492.
- Rosenberg, S. A., Packard, B. S., Aebersold, P. M., Solomon, D., Topalian, S. L., Toy, S. T., Simon, P., Lotze, M. T., Yang, J. C., Seipp, C. A., and et al.** (1988). Use of tumor-infiltrating

lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *The New England journal of medicine* 319, 1676-1680.

Rosenberg, S. A., and Restifo, N. P. (2015). Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* 348, 62-68.

Ross, S. H., and Cantrell, D. A. (2018). Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 36, 411-433.

Rotte, A. (2019). Combination of CTLA-4 and PD-1 blockers for treatment of cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research* : CR 38, 255.

Rotte, A., D'Orazi, G., and Bhandaru, M. (2018). Nobel committee honors tumor immunologists. *Journal of experimental & clinical cancer research* : CR 37, 262.

Rudd, C. E., Taylor, A., and Schneider, H. (2009). CD28 and CTLA-4 coreceptor expression and signal transduction. *Immunol Rev* 229, 12-26.

Sabado, R. L., Balan, S., and Bhardwaj, N. (2017). Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell research* 27, 74-95.

Sabins, N. C., Chornoguz, O., Leander, K., Kaplan, F., Carter, R., Kinder, M., Bachman, K., Verona, R., Shen, S., Bhargava, V., and Santulli-Marotto, S. (2017). TIM-3 Engagement Promotes Effector Memory T Cell Differentiation of Human Antigen-Specific CD8 T Cells by Activating mTORC1. *J Immunol* 199, 4091-4102.

Sakuishi, K., Ngiew, S. F., Sullivan, J. M., Teng, M. W., Kuchroo, V. K., Smyth, M. J., and Anderson, A. C. (2013). TIM3(+)FOXP3(+) regulatory T cells are tissue-specific promoters of T-cell dysfunction in cancer. *Oncoimmunology* 2, e23849.

Schuster, M., Nechansky, A., and Kircheis, R. (2006). Cancer immunotherapy. *Biotechnology journal* 1, 138-147.

Schuster, M., Umana, P., Ferrara, C., Brunker, P., Gerdes, C., Waxenecker, G., Wiederkum, S., Schwager, C., Loibner, H., Himmler, G., and Mudde, G. C. (2005). Improved effector functions of a therapeutic monoclonal Lewis Y-specific antibody by glycoform engineering. *Cancer Res* 65, 7934-7941.

Scott, A. M., Allison, J. P., and Wolchok, J. D. (2012). Monoclonal antibodies in cancer therapy. *Cancer immunity* 12, 14.

Sermer, D., and Brentjens, R. (2019). CAR T-cell therapy: Full speed ahead. *Hematological oncology* 37 Suppl 1, 95-100.

Sharifi, N., Gulley, J. L., and Dahut, W. L. (2005). Androgen deprivation therapy for prostate cancer. *JAMA* 294, 238-244.

Shi, H., Qi, X., Ma, B., Cao, Y., Wang, L., Sun, L., and Niu, H. (2015). The status, limitation and improvement of adoptive cellular immunotherapy in advanced urologic malignancies. *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu* 27, 128-137.

Siegel, R. L., Miller, K. D., and Jemal, A. (2018). Cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians* 68, 7-30.

Silberstein, E. B. (2005). Teletherapy and radiopharmaceutical therapy of painful bone metastases. *Seminars in nuclear medicine* 35, 152-158.

Simpson, T. R., Li, F., Montalvo-Ortiz, W., Sepulveda, M. A., Bergerhoff, K., Arce, F., Roddie, C., Henry, J. Y., Yagita, H., Wolchok, J. D., *et al.* (2013). Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. *J Exp Med* 210, 1695-1710.

Sims, G. P., Rowe, D. C., Rietdijk, S. T., Herbst, R., and Coyle, A. J. (2010). HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer. *Annu Rev Immunol* 28, 367-388.

Skowronek, J. (2017). Current status of brachytherapy in cancer treatment - short overview. *Journal of contemporary brachytherapy* 9, 581-589.

- Smrž, D., Dráberová, L., and Dráber, P. (2007).** Non-apoptotic phosphatidylserine externalization induced by engagement of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins. *J Biol Chem* 282, 10487-10497.
- Smyth, M. J. (2017).** Multiple approaches to immunotherapy - the new pillar of cancer treatment. *Immunology and cell biology* 95, 323-324.
- So, E. C., Khaladj-Ghom, A., Ji, Y., Amin, J., Song, Y., Burch, E., Zhou, H., Sun, H., Chen, S., Bentzen, S., et al. (2019).** NK cell expression of Tim-3: First impressions matter. *Immunobiology* 224, 362-370.
- Som, A., Mandaliya, R., Alsaadi, D., Farshidpour, M., Charabaty, A., Malhotra, N., and Mattar, M. C. (2019).** Immune checkpoint inhibitor-induced colitis: A comprehensive review. *World journal of clinical cases* 7, 405-418.
- Southam, C. M., Brunschwig, A., Levin, A. G., and Dizon, Q. S. (1966).** Effect of leukocytes on transplantability of human cancer. *Cancer* 19, 1743-1753.
- Steinman, R. M. (2012).** Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol* 30, 1-22.
- Steinman, R. M., and Cohn, Z. A. (1973).** Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 137, 1142-1162.
- Steinman, R. M., and Swanson, J. (1995).** The endocytic activity of dendritic cells. *J Exp Med* 182, 283-288.
- Stephenson, K. B., Barra, N. G., Davies, E., Ashkar, A. A., and Lichty, B. D. (2012).** Expressing human interleukin-15 from oncolytic vesicular stomatitis virus improves survival in a murine metastatic colon adenocarcinoma model through the enhancement of anti-tumor immunity. *Cancer gene therapy* 19, 238-246.
- Stockham, A., Balagamwala, E. H., Singh, A. D., and Macklis, R. (2013).** Teletherapy: advanced techniques. *Developments in ophthalmology* 52, 15-28.
- Su, H., Xie, H., Dai, C., Ren, Y., She, Y., Xu, L., Chen, D., Xie, D., Zhang, L., Jiang, G., and Chen, C. (2018).** Characterization of TIM-3 expression and its prognostic value in patients with surgically resected lung adenocarcinoma. *Lung cancer* 121, 18-24.
- Taborska, P., Stakheev, D., Strizova, Z., Vavrova, K., Podrazil, M., Bartunkova, J., and Smrž, D. (2017).** Personalized ex vivo multiple peptide enrichment and detection of T cells reactive to multiple tumor-associated antigens in prostate cancer patients. *Medical oncology* 34, 173.
- Takamura, S., Tsuji-Kawahara, S., Yagita, H., Akiba, H., Sakamoto, M., Chikaishi, T., Kato, M., and Miyazawa, M. (2010).** Premature terminal exhaustion of Friend virus-specific effector CD8⁺ T cells by rapid induction of multiple inhibitory receptors. *J Immunol* 184, 4696-4707.
- Takano, S., Saito, H., and Ikeguchi, M. (2016).** An increased number of PD-1⁺ and Tim-3⁺ CD8⁺ T cells is involved in immune evasion in gastric cancer. *Surgery today* 46, 1341-1347.
- Tivol, E. A., Borriello, F., Schweitzer, A. N., Lynch, W. P., Bluestone, J. A., and Sharpe, A. H. (1995).** Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 3, 541-547.
- Tomkowicz, B., Walsh, E., Cotty, A., Verona, R., Sabins, N., Kaplan, F., Santulli-Marotto, S., Chin, C. N., Mooney, J., Lingham, R. B., et al. (2015).** TIM-3 Suppresses Anti-CD3/CD28-Induced TCR Activation and IL-2 Expression through the NFAT Signaling Pathway. *PLoS One* 10, e0140694.
- Topalian, S. L., Drake, C. G., and Pardoll, D. M. (2015).** Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* 27, 450-461.
- Tsai, K. K., and Daud, A. I. (2015).** Nivolumab plus ipilimumab in the treatment of advanced melanoma. *Journal of hematology & oncology* 8, 123.

- Vaitaitis, G. M., and Wagner, D. H., Jr.** (2012). Galectin-9 controls CD40 signaling through a Tim-3 independent mechanism and redirects the cytokine profile of pathogenic T cells in autoimmunity. *PLoS One* 7, e38708.
- van de Weyer, P. S., Muehlfeit, M., Klose, C., Bonventre, J. V., Walz, G., and Kuehn, E. W.** (2006). A highly conserved tyrosine of Tim-3 is phosphorylated upon stimulation by its ligand galectin-9. *Biochemical and biophysical research communications* 351, 571-576.
- Varghese, S., Rabkin, S. D., Liu, R., Nielsen, P. G., Ipe, T., and Martuza, R. L.** (2006). Enhanced therapeutic efficacy of IL-12, but not GM-CSF, expressing oncolytic herpes simplex virus for transgenic mouse derived prostate cancers. *Cancer gene therapy* 13, 253-265.
- Varshney, P., Yadav, V., and Saini, N.** (2016). Lipid rafts in immune signalling: current progress and future perspective. *Immunology* 149, 13-24.
- Ventola, C. L.** (2017). Cancer Immunotherapy, Part 1: Current Strategies and Agents. *P & T : a peer-reviewed journal for formulary management* 42, 375-383.
- Vermaelen, K. Y., Carro-Muino, I., Lambrecht, B. N., and Pauwels, R. A.** (2001). Specific migratory dendritic cells rapidly transport antigen from the airways to the thoracic lymph nodes. *J Exp Med* 193, 51-60.
- Voliotis, D., and Diehl, V.** (2002). Challenges in treating hematologic malignancies. *Semin Oncol* 29, 30-39.
- Wada, J., and Kanwar, Y. S.** (1997). Identification and characterization of galectin-9, a novel beta-galactoside-binding mammalian lectin. *J Biol Chem* 272, 6078-6086.
- Waldmann, T. A.** (2018). Cytokines in Cancer Immunotherapy. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 10.
- Wang, Y., Singh, N. K., Spear, T. T., Hellman, L. M., Piepenbrink, K. H., McMahan, R. H., Rosen, H. R., Vander Kooi, C. W., Nishimura, M. I., and Baker, B. M.** (2017). How an alloreactive T-cell receptor achieves peptide and MHC specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, E4792-E4801.
- Weber, J. S., D'Angelo, S. P., Minor, D., Hodi, F. S., Gutzmer, R., Neyns, B., Hoeller, C., Khushalani, N. I., Miller, W. H., Jr., Lao, C. D., *et al.*** (2015). Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* 16, 375-384.
- Weber, J. S., Hodi, F. S., Wolchok, J. D., Topalian, S. L., Schadendorf, D., Larkin, J., Sznol, M., Long, G. V., Li, H., Waxman, I. M., *et al.*** (2017). Safety Profile of Nivolumab Monotherapy: A Pooled Analysis of Patients With Advanced Melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 35, 785-792.
- Wei, S. C., Levine, J. H., Cogdill, A. P., Zhao, Y., Anang, N. A. S., Andrews, M. C., Sharma, P., Wang, J., Wargo, J. A., Pe'er, D., and Allison, J. P.** (2017). Distinct Cellular Mechanisms Underlie Anti-CTLA-4 and Anti-PD-1 Checkpoint Blockade. *Cell* 170, 1120-1133 e1117.
- Weinstock, C., Khozin, S., Suzman, D., Zhang, L., Tang, S., Wahby, S., Goldberg, K. B., Kim, G., and Pazdur, R.** (2017). U.S. Food and Drug Administration Approval Summary: Atezolizumab for Metastatic Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 23, 4534-4539.
- Wherry, E. J., and Kurachi, M.** (2015). Molecular and cellular insights into T cell exhaustion. *Nat Rev Immunol* 15, 486-499.
- Wiener, Z., Kohalmi, B., Pocza, P., Jeager, J., Tolgyesi, G., Toth, S., Gorbe, E., Papp, Z., and Falus, A.** (2007). TIM-3 is expressed in melanoma cells and is upregulated in TGF-beta stimulated mast cells. *J Invest Dermatol* 127, 906-914.
- Williams, M. A., and Bevan, M. J.** (2007). Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol* 25, 171-192.

- Wong, Y. N. S., Joshi, K., Pule, M., Peggs, K. S., Swanton, C., Quezada, S. A., and Linch, M.** (2017). Evolving adoptive cellular therapies in urological malignancies. *The Lancet Oncology* *18*, e341-e353.
- Wu, C., Thalhamer, T., Franca, R. F., Xiao, S., Wang, C., Hotta, C., Zhu, C., Hirashima, M., Anderson, A. C., and Kuchroo, V. K.** (2014). Galectin-9-CD44 interaction enhances stability and function of adaptive regulatory T cells. *Immunity* *41*, 270-282.
- Wu, J., Lin, G., Zhu, Y., Zhang, H., Shi, G., Shen, Y., Zhu, Y., Dai, B., and Ye, D.** (2017). Low TIM3 expression indicates poor prognosis of metastatic prostate cancer and acts as an independent predictor of castration resistant status. *Scientific reports* *7*, 8869.
- Wu, W., Shi, Y., Li, J., Chen, F., Chen, Z., and Zheng, M.** (2011). Tim-3 expression on peripheral T cell subsets correlates with disease progression in hepatitis B infection. *Virology journal* *8*, 113.
- Xiao, Y. F., Jie, M. M., Li, B. S., Hu, C. J., Xie, R., Tang, B., and Yang, S. M.** (2015). Peptide-Based Treatment: A Promising Cancer Therapy. *Journal of immunology research* *2015*, 761820.
- Xu, Y., Zhang, H., Huang, Y., Rui, X., and Zheng, F.** (2017). Role of TIM-3 in ovarian cancer. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico* *19*, 1079-1083.
- Yaddanapudi, K., Mitchell, R. A., and Eaton, J. W.** (2013). Cancer vaccines: Looking to the future. *Oncoimmunology* *2*, e23403.
- Yang, L., Anderson, D. E., Kuchroo, J., and Hafler, D. A.** (2008). Lack of TIM-3 immunoregulation in multiple sclerosis. *J Immunol* *180*, 4409-4414.
- Yang, R., and Hung, M. C.** (2017). The role of T-cell immunoglobulin mucin-3 and its ligand galectin-9 in antitumor immunity and cancer immunotherapy. *Science China Life sciences* *60*, 1058-1064.
- Yang, S., Archer, G. E., Flores, C. E., Mitchell, D. A., and Sampson, J. H.** (2013). A cytokine cocktail directly modulates the phenotype of DC-enriched anti-tumor T cells to convey potent anti-tumor activities in a murine model. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* *62*, 1649-1662.
- Yi, M., Qin, S., Zhao, W., Yu, S., Chu, Q., and Wu, K.** (2018). The role of neoantigen in immune checkpoint blockade therapy. *Experimental hematology & oncology* *7*, 28.
- Zhan, H. L., Gao, X., Pu, X. Y., Li, W., Li, Z. J., Zhou, X. F., and Qiu, J. G.** (2012). A randomized controlled trial of postoperative tumor lysate-pulsed dendritic cells and cytokine-induced killer cells immunotherapy in patients with localized and locally advanced renal cell carcinoma. *Chinese medical journal* *125*, 3771-3777.
- Zhang, J., Daley, D., Akhabir, L., Stefanowicz, D., Chan-Yeung, M., Becker, A. B., Laprise, C., Pare, P. D., and Sandford, A. J.** (2009). Lack of association of TIM3 polymorphisms and allergic phenotypes. *BMC medical genetics* *10*, 62.
- Zhu, C., Anderson, A. C., Schubart, A., Xiong, H., Imitola, J., Khoury, S. J., Zheng, X. X., Strom, T. B., and Kuchroo, V. K.** (2005). The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol* *6*, 1245-1252.